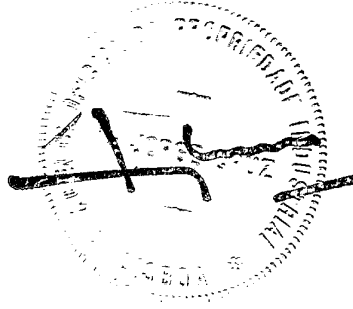


88.479



MEMORIA DESCRITIVA

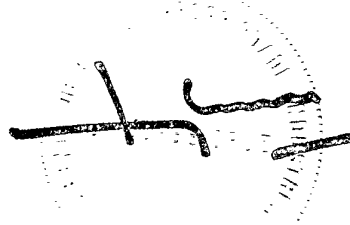
Resumo

O presente invento diz respeito a um método para cultura de uma célula hospedeira recombinante que consiste em: se determinar um factor polipeptídico para uma célula hospedeira dependente de factores polipeptídicos; se transformar a referida célula hospedeira com ácido nucleico codificador do referido factor polipeptídico; se transformar a célula hospedeira com ácido nucleico codificador de uma proteína pretendida; e se cultivar as células hospedeiras transformadas num meio sem o factor polipeptídico.

=====

GENENTECH INC.

"METODO PARA CULTURA DE CELULAS RECOMBINANTES"



Campo do invento

Este invento está relacionado com métodos para a cultura de células hospedeiras de vertebrados transformadas para produzir uma proteína pretendida. Em particular, ele relaciona-se com a utilização da tecnologia recombinante para criar células hospedeiras que produzirão factores necessários à sua sobrevivência e crescimento em cultura.

Fundamento do invento

A última década tem sido um crescimento explosivo no conhecimento da biologia molecular e comercialização de tal conhecimento. Fez-se um enorme sucesso na clonagem e expressão de genes codificadores de proteínas que anteriormente estavam disponíveis em quantidades muito pequenas, como sejam a hormona de crescimento humana, o activador do plasminogénio de tecido e várias linfoquinas, apenas para nomear algumas. Inicialmente, fizeram-se tentativas para produzir estas proteínas em sistemas de expressão bacterianos ou de leveduras. Muitas proteínas devem ser preferencialmente produzidas em culturas celulares. As razões que influenciam a utilização de culturas celulares são: glicosilação da proteína pretendida, facilidade de purificação dos produtos secretados e processamento correcto da proteína com enrolamento correcto e formação de ligações dissulfureto.

Uma vez o gene codificador da proteína pretendida expresso numa linha celular de mamífero a sua produção deve ser então optimizada. A optimização da produção de proteína em cultura de células pode ser feita por vários métodos. O melhoramento pode ser conseguido, por exemplo por optimização do ambiente fisicoquímico, nutritivo e hormonal da célula.

As células de mamífero in vivo estão num

ambiente homeostático cuidadosamente equilibrado. Desde muito cedo na história da cultura de células se reconheceu as vantagens da obtenção de um meio completamente definido para a cultura de células in vitro. (Lewis, M.R. e Lewis, W.H., Anat. Rec. 5:277 [1911] 7). O meio definido refere-se tipicamente aos compostos nutritivos e hormonais específicos incluídos no meio necessário à sobrevivência e ao crescimento. A maior parte dos tipos celulares têm necessidades específicas relativamente à gama ótima de parâmetros físicos para crescimento e funcionamento. Os parâmetros físico-químicos que podem ser controlados em diferentes sistemas de cultura de células são por exemplo: temperatura, pH, pO_2 e osmolaridade. As necessidades nutritivas das células são geralmente fornecidas em formulações padronizadas de meios desenvolvidos para se obter um ambiente ótimo. Os nutrientes podem ser divididos em várias categorias: aminoácidos e seus derivados, ácidos gordos, lípidos complexos, hidratos de carbono, açúcares, vitaminas e derivados de ácidos nucleicos. Não só as necessidades absolutas mas também as concentrações relativas dos nutrientes devem ser otimizados para cada tipo individual de célula.

A maior parte dos tipos celulares não crescerá e/ou secretará proteínas em condições ótimas num meio consistindo apenas em nutrientes, mesmo quando os constituintes nutritivos estão otimizados. É por este motivo que o soro permaneceu como um componente essencial do meio para o crescimento de células em cultura. Várias experiências conduziram à hipótese de que o papel do soro na cultura de células era proporcionar um complexo de hormonas estimuladoras do crescimento para um determinado tipo celular. (Sato, G.H. et al., em Biochemical Action of Hormones, Vol.III [G. Litwak ed.] Academic Press, N.Y., página 391). Uma linha celular de pituitária foi cultivada em meio sem soro suplementado com hormonas, factores de crescimento e transferrina. (Hayashi, I. e Sato, G., Nature [Lond] 159:132 (1976) 7. Subsequentemente, desenvolveram-se condições de cultura sem soro e su-

plementadas com hormonas para o crescimento de várias linhas celulares originárias de diferentes tecidos (Mather. J. e Sato, G., Exp. Cell Res. 120:191 /19797; Barnes, D. e Sato, G., Cell 22:69 /19817). Estes estudos conduziram a várias conclusões respeitantes ao crescimento de células em meio sem soro. O soro pode ser substituído por uma mistura de hormonas, factores de crescimento e proteínas de transporte. Os suplementos necessários (contendo as hormonas, factores de crescimento e proteínas de transporte) ao meio sem soro podem diferir para diferentes tipos celulares. Os suplementos, tradicionalmente, têm sido fornecidos como parte de misturas biológicas complexas tais como soro ou extractos de órgãos. O meio "hormonal" pode ser optimizado para reduzir ou eliminar a necessidade de factores de crescimento não definidos, remover factores inibidores ou fornecer hormonas críticas em níveis desejáveis.

As células frequentemente necessitam de uma ou mais hormonas de cada um dos grupos que se seguem: esteróides, prostaglandinas, factores de crescimento, hormonas da pituitária e hormonas peptídicas. A maior parte dos tipos celulares necessitam de insulina para sobreviver em meio sem soro. (Sato, G.H. et al. em Growth of Cells in Hormonally Defined Media, /Cold Spring Harbor Press, N.Y., (1982)7. Foram divulgadas determinadas linhas celulares mutantes que são independentes da insulina. (Mendiaz, E. et al., In Vitro Cell. & Dev. Biol. 22/27:66/19867; Serrero, G., In Vitro Cell. & Biol. 21/97:537/19857). Além das hormonas, as células podem necessitar de proteínas de transporte como sejam a transferrina (proteína do transporte de ferro no plasma), ceruloplasmina (uma proteína do transporte do cobre) e lipoproteínas de alta densidade (um veículo de lípidos), adicionadas aos meios de cultura de células. A série de hormonas ou proteínas óptimas de transporte variará para cada tipo celular. A maior parte destas hormonas ou proteínas de transporte têm sido adicionadas exógenamente ou, num caso raro, encontrou-se uma linha celular que não necessita de um factor

particular.

Recentemente, tem-se estudado a proliferação celular para elaborar os acontecimentos necessários para passar da paragem de crescimento quiescente à indução celular no sentido da proliferação. Encontraram-se vários factores envolvidos naquela transformação. Observou-se que estas células transformadas produzem factores de crescimento peptídicos em cultura. (Kaplan, P.L. et al., PNAS 79:485-489 [1982]). A secreção por parte de uma célula de um factor a que a mesma célula pode responder foi referido como um sistema "autócrino". Têm sido descritos vários factores como autócrinos: bombesina, interleuquina-2, (Duprez, V. et al PNAS 82:6932 [1985]); insulina, (Serrero, G. In Vitro Cellular & Dev. Biol. 21/9:537 [1985]); factor de crescimento transformante-alfa (TGF- α), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crescimento transformante-beta (TGF- β), (Sporn, M.B. & Roberts, A.B., Nature 313:745 [1985]); factor de crescimento de sarcoma (SGF), (Anzano, M.A. et al., PNAS 80:6264 [1983]; e, factor de crescimento hemopoiético, factor estimulante das colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), (Lang, R.A. et al., Cell 43:531 [1985]).

Constitui um objectivo do presente invento proporcionar um meio definido para células hospedeiras recombinantes particulares. Um outro objectivo deste invento é eliminar problemas associados ao fornecimento de factores polipeptídicos necessários para a manutenção e crescimento de células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, certos factores polipeptídicos, tais como insulina, são instáveis nas algumas condições de cultura. Constitui um objectivo do invento proporcionar um ambiente local para a célula hospedeira que seja óptimo para o crescimento ou sobrevivência. Mais particularmente, é um objectivo do invento eliminar a necessidade de testar previamente, por exemplo a pureza, factores polipeptídicos necessários às células hospedeiras em culturas celulares. Ainda um outro objectivo deste invento é baixar o

risco de contaminação de uma cultura celular eliminando a necessidade de adicionar factores exógenos. Um outro objectivo é produzir uma linha celular hospedeira mais robusta proporcionando a produção autócrina de factores polipeptídicos necessários à sobrevivência e crescimento de células hospedeiras recombinantes em cultura. Um outro objectivo é produzir células hospedeiras recombinantes que sejam menos sensíveis às condições do meio. Ainda um outro objectivo é proporcionar um ambiente localizado para o crescimento ou sobrevivência celulares. Ainda um outro objectivo é melhorar a eficácia da cultura de células através da produção autócrina de factores polipeptídicos necessários. Ainda uma outra vantagem é baixar o custo do meio definido.

Sumário do invento

Os objectivos deste invento são conseguidos através de um novo método para a cultura de uma célula hospedeira recombinante caracterizado por: selecção de uma célula hospedeira dependente de polipeptídeos que requiere um factor polipeptídico para a sua sobrevivência ou crescimento; transformação da célula hospedeira com um ácido nucleico codificador do factor polipeptídico particular; transformação de uma célula hospedeira com ácido nucleico codificando uma proteína pretendida; e cultura das células hospedeiras transformadas num meio sem o factor polipeptídico particular. As células produzidas de acordo com este invento podem sobreviver ou crescer num meio sem o factor polipeptídico. A própria célula hospedeira recombinante satisfaz a sua necessidade relativamente ao factor polipeptídico. Até ao presente invento não foi apreciado que uma célula hospedeira pudesse ser alterada, usando meios recombinantes de modo a fornecer o(s) factor(es) polipeptídico(s) necessário(s) à sua própria sobrevivência ou crescimento em cultura. Surpreendentemente, o fornecimento do factor polipeptídico necessário não limitou a capacidade da célula hospedeira para produzir a proteína

pretendida em quantidades usáveis. Este invento proporciona poupanças económicas significativas na cultura de células recombinantes. Esta poupança no contexto da produção em larga escala de uma proteína pretendida é da ordem das dezenas de milhões de dólares. Deste modo, um aspecto do invento é dirigido a um método para a cultura de uma célula hospedeira num meio sem necessidade de factor(es) polipeptídico(s) para a sua sobrevivência ou crescimento. Num outro aspecto o invento é dirigido a uma célula hospedeira transformada para expressar um factor polipeptídico necessário ao seu próprio crescimento ou sobrevivência. Ainda um outro aspecto do invento é a cultura compreendendo células hospedeiras transformadas com o factor polipeptídico num meio sem o(s) factor(es) polipeptídico(s) necessário(s) ao crescimento e manutenção da célula hospedeira.

Breve descrição dos desenhos

Figura 1. Construção de um vector de expressão da preproinsulina humana, pSVEHIGDHFR, usado para estabelecer uma linha celular independente da insulina para a produção de uma proteína pretendida.

Figura 2. Construção de um vector de expressão da preproinsulina humana, pSVEHIGNeo, usado para estabelecer uma linha celular independente da insulina para a produção de uma proteína pretendida.

Figura 3. Construção de pCVSVD22preUKS4 um plasmídeo usado na construção de pSVEHIGDHFR.

Figura 4. Construção de um vector de expressão da descarboxilase da ornitina (ODC) usado para amplificação do gene ODC e do gene da preproinsulina cotransfectado.

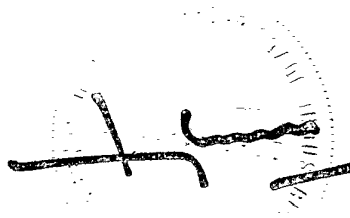


Figura 5. (a) Crescimento de duas linhas celulares independentes da insulina e de uma linha celular testemunha na presença de 5% de FBS total.

(b) Crescimento de duas linhas celulares independentes da insulina e da linha celular testemunha em FBS extraído com 1% de carvão/dextrano (tratado para remover a insulina do meio).

Figura 6. (a) Crescimento de células testemunha (CHO/DHFR⁻, sem preproinsulina) em meio sem soro na presença de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de insulina exógena.

(b) Padrão de crescimento típico dos clones 7 e 12 sujeitos a concentração variável de insulina na ausência de soro.

Figura 7. Em cultura na ausência de soro e de insulina, o conjunto DFMO (100 μM) e o clone 13 não ampliado da linha C₂B-proinsulina (Cl. 13), que foi seleccionada quanto à independência relativamente à insulina, apresentaram títulos bastante mais elevados relativamente a C₂B (testemunha) em condições idênticas. A célula C₂B/Clone 13 no final atingiu títulos de tPA equivalentes à testemunha C₂B com 20 $\mu\text{g/ml}$ de insulina (C₂B + insulina).

Figura 8. Diagrama de um vector de expressão, pRKTF, codificador da transferrina.

Figura 9. Construção do vector de expressão pRK5 no qual foi inserido o cDNA codificador da transferrina.

Figura 10 a 12. Mostram a construção do plasmídeo pCI52.8c28D.

Descrição detalhada

Conforme aqui é usado, "factor polipeptídico" refere-se a qualquer proteína necessária à sobrevivência ou crescimento de uma célula hospedeira em cultura. O factor polipeptídico pode ser uma hormona, factor de crescimento, hormona peptídica, factor autócrino, proteína de transporte, oncogene/proto-oncogene e similares. São exemplos de factores polipeptídicos hormonais a insulina, proinsulina, hormona estimuladora do folículo (FSH), calcitonina, hormona leutinizante (LH), glucagon, hormona paratiróide (PTH), hormona estimuladora da tiróide (TSH), hormona de libertação da tiróide (TRH), tiroxina (T_3), hormona de crescimento. São exemplos adicionais de factores polipeptídicos as proteínas de transporte, tais como transferrina, albumina do soro, ceruloplasma, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). Outros exemplos de factores polipeptídicos, por vezes descritos como autócrinos por, nalguns casos, a célula que os segrega responder ao factor secretado, são interleuquina-2, insulina, factor de crescimento tipo insulina I e II, factor de crescimento transformante alfa (TGF- α), factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), bombesina, eritropoietina, factor de crescimento transformante-beta (TGF- β), factor de crescimento de sarcoma (SGF), factor de crescimento epidérmico (EGF), factor de crescimento fibroblástico (FGF), trombina, factor de crescimento dos nervos, factor de crescimento hemopoietico e factor estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). Ainda outros exemplos de factores polipeptídicos são peptídicos resultantes da expressão de certos oncogenes/proto-oncogenes. As proteínas codificadoras por estes proto-oncogenes que estão incluídos dentro dos factores polipeptídicos deste invento são factores de crescimento, proteínas de transdução e receptores de membrana. Um exemplo de um factor de crescimento é PDGF (subunidade β) codificada pelo oncogene sis. São exemplos de proteínas de membrana periféricas o receptor trancado da superfície celular para EGF codificado por erb-B, o receptor da

superfície celular para M-CSF/CSF-1 codificado por fms e os receptores codificados por neu e ros. Um exemplo de uma proteína de transdução é a tirosina cinase na superfície interna da membrana plasmática codificada por abl. Se bem que estes factores polipeptídicos codificados por oncogenes/proto-oncogenes não sejam tipicamente adicionados a um meio de cultura, eles podem substituir um outro factor polipeptídico que seja necessário. Os factores de crescimento deste invento não são enzimáticos e portanto não incluem proteínas tais como di-hidrofolato redutase (DHFR), ornitina descarboxilase (ODC), timidina cinase ou fosfotransferase.

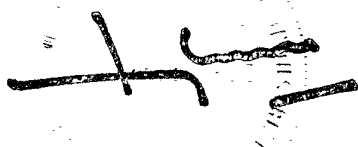
"Proteína pretendida" refere-se a uma proteína que se pretende que seja expressa numa célula hospedeira, mas que a célula hospedeira não produz normalmente ou que produz em pequenas quantidades e que portanto não é normalmente necessário à existência continuada da célula. A proteína pretendida inclui uma proteína tendo desde cerca de cinco aminoácidos até proteínas muito maiores como seja o factor VIII. Tal proteína inclui qualquer molécula tendo a sequência de pre- ou prepro-aminoácidos assim como variantes de aminoácidos ou de glicosilação (incluindo alelos naturais) capazes de apresentar uma actividade biológica comum à proteína pretendida. São exemplos de tais proteínas: hormonas de crescimento, insulina, factor VIII, activador do plasminogénio de tecido, factor de necrose tumoral alfa e beta, linfotoxina, encefalinase, albumina do soro humano, substância inibidora de muleriano, relaxina, proteína do factor de tecido, inibina, eritropoietina, interferão alfa, beta e gama, superóxido dismutase, factor de aceleração do decaimento, antigénios virais tal como, por exemplo, uma parte do envólucro de AIDS e interleuquina. A proteína pretendida poderá também ser um factor polipeptídico.

O termo "cultura celular" ou "cultura" refere-se a populações de células de vertebrados cultivadas a partir uma célula isolada de tal forma que a população cresce

ou sobrevive durante uma ou mais gerações. O crescimento ou sobrevivência de células de vertebrados em cultura, algumas vezes referido como cultura de tecidos, tornou-se um processo de rotina. Ver por exemplo Mammalian Cell Culture, The Use of Serum-Free Hormone-Supplemented Media, Ed. Mather, J.P. (Plenum Press, N.Y., 1984).

O termo "célula hospedeira" refere-se às células de vertebrados capazes de crescerem em cultura e expressarem uma proteína pretendida e um(s) factor(e) polipeptídico(s). Células hospedeiras adequadas incluem por exemplo linha CV1 de rim de macaco transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); linha de rim embrionário humano (293, Graham, F.L. et al., J. Gen. Virol. 36:59 [1977]); células de rim de hamster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovário de hamster chinês-DHFR (CHO, Erlaub and Chasin, PNAS (USA) 77:4216 [1980]); células Sertoli de ratinho (TM4, Mather, J.P. Biol. Reprod. 23:243-251 [1980]); células de rim de macaco (CV1 ATCC CCL 70); células de rim de macaco verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células de rim canino (MDCK, ATCC CCL 31); células de fígado de rato búfalo (BRL 3A, ATCC CCL 75); células de fígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamário de ratinho (MMT 060562, ATCC CCL 51); e células TR1 (Mather, J.P. et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 [1982]). Se bem que as células hospedeiras preferidas deste invento sejam células de vertebrados, outras células eucarióticas poderão ser usadas, como por exemplo células de insecto.

As células hospedeiras podem ser transformadas com ácido nucleico codificador do factor polipeptídico antes, após ou simultaneamente com o ácido nucleico codificador da proteína pretendida. Prefere-se introduzir antes o ácido nucleico codificador do polipeptídeo proporcionando assim uma "célula hospedeira independente de factor polipeptídico" capaz de ser transformada com o ácido nucleico codificador de uma proteína pretendida.



"Célula hospedeira dependente de factores polipeptídicos" refere-se a uma célula hospedeira requerendo um ou mais factores polipeptídicos no meio de cultura para crescimento ou sobrevivência. O(s) factor(es) polipeptídico(s) para uma célula hospedeira particular é determinado usando métodos gerais conhecidos como os descritos abaixo. A eliminação do factor polipeptídico do meio pode resultar na morte da célula ou em inibição do crescimento. Resultado este que depende da célula hospedeira particular, do factor polipeptídico, condições de cultura e outros factores tais como densidade celular.

O termo "meio" refere-se ao ambiente aquoso em que as células de vertebrados são crescidas em cultura. O meio compreende o ambiente fisicoquímico, nutritivo e hormonal. Tradicionalmente o meio tem sido formulado pela adição de factores nutritivos e de crescimento necessários ao crescimento ou sobrevivência. "Meio sem soro" refere-se a um meio que não inclui soro. As hormonas, factores de crescimento, proteínas de transporte, hormonas peptídicas e similares tipicamente encontradas no soro e que são necessárias à sobrevivência ou crescimento de células particulares em culturas são tipicamente adicionados a meio sem soro. Um "meio definido" refere-se a um meio compreendendo requisitos nutritivos e hormonais necessários à sobrevivência e crescimento das células em cultura de tal modo que os componentes do meio sejam conhecidos. Um meio definido proporcionado pelo método do presente invento estabelece um ambiente local para uma célula hospedeira particular que pode diferir do ambiente geral do meio.

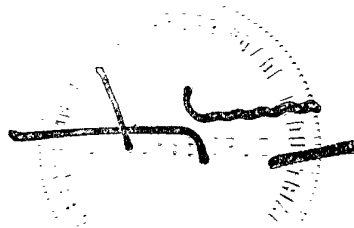
A determinação do factor(es) polipeptídico(s) particular(es) e ao mesmo tempo conseguiu-se um meio definido de que uma célula hospedeira recombinante necessita pode ser conseguido pelos técnicos de cultura de células. As linhas celulares estão rotineiramente em meio suplementado com soro. A maior parte das linhas celulares estabelecidas têm



sido cultivadas em meio suplementado com soro durante um período de anos. Pode-se assumir em maior ou menor grau o suplemento de soro fornece a estas células as hormonas necessárias ao crescimento e sobrevivência in vivo e/ou as células adaptaram-se à ausência de algumas hormonas necessárias ou a níveis reduzidos destas.

Existem várias abordagens para a definição dos factores polipeptídicos necessários a uma determinada linha celular. O método escolhido dependerá da linha celular. O técnico familiarizado com a matéria conhece várias possibilidades de que são exemplos as seguintes. O passo inicial é conseguir as condições em que as células sobrevivem e/ou crescem lentamente durante 3-6 dias. Na maior parte dos tipos celulares isto é, em parte, uma função da densidade de inóculo. Para uma célula que adere e sobrevive em meio sem soro é apenas necessário seleccionar a densidade de inóculo adequada e começar a testar hormonas que mostram efeitos promotores do crescimento. Uma vez encontrado o suplemento hormonal óptimo, a densidade do inóculo necessária à sobrevivência diminuirá. Nalguns casos a eficácia de sementeira em hormonas será semelhante à obtida com soro e se bem que isto não seja verdadeiro para todos os tipos de células. Isto poderá ser devido à necessidade de adicionar factores de aderência ou factores de crescimento necessários apenas inicialmente ou em concentrações mais elevadas do que as necessárias quando as células são semeadas a densidades elevadas. Muitas células, transformadas e normais, são capazes de produzir substâncias que são necessárias à sua aderência ou crescimento.

No entanto, algumas linhas celulares não sobrevivem mesmo 24 horas ou não aderem à placa em meio sem soro. Para estas células são possíveis várias abordagens iniciais: pré-revestimento da placa com soro; sementeira das células em meio contendo soro durante 12-24 horas e depois mudar para meio sem soro; reduzir as concentrações de soro até ao ponto em que as células sobreviverão mas não crescerão; e usar



vários factores de aderência.

Os vários factores polipeptídicos podem então ser testados nestas condições mínimas. Quando se encontram as condições óptimas de crescimento, o soro (ou passo de pré-incubação) pode então ser omitido e/ou substituído com factor de aderência purificado e/ou factores polipeptídicos.

As células em meio sem soro necessitam geralmente de insulina e transferrina num meio sem soro para o crescimento óptimo. Estes dois factores deverão ser testados em primeiro lugar. A maior parte das linhas celulares necessita de um ou mais factores de crescimento. Estes incluem factor de crescimento epidérmico (EGF), factor de crescimento fibroblástico (FGF), factores de crescimento tipo insulina I e II (IGFI, IGFII), factor de crescimento dos nervos (NGF), etc. Outras classes de factores que podem ser necessárias incluem prostaglandinas; esteróides; proteínas de transporte ou ligação (e.g. cerufoplasmina, lipoproteína de alta e baixa densidade [γ -HDL, LDL], albumina); hormonas; e ácidos gordos.

O teste de factores polipeptídicos será melhor efectuado segundo passos discretos testando novos factores polipeptídicos na presença dos que se verificou serem estimuladores do crescimento. Isto é essencial nalguns casos uma vez que os efeitos dos factores polipeptídicos são por vezes apenas aditivos. Como alternativa, alguns factores polipeptídicos podem estimular o crescimento isoladamente mas os seus efeitos quando em conjunto anulam-se ou são inibidores.

Uma substituição completa do soro por factores polipeptídicos permitiria idealmente um tempo de duplicação e eficácia desementeira iguais (ou nalguns casos superior) aos observados para a linha celular em soro e ainda a capacidade de fazer subculturas sucessivas da linha celular



no meio sem soro suplementado com factores polipeptídicos. Seria de esperar que a dose de cada factor polipeptídico adicionado caísse dentro da gama fisiológica para aquele factor. Deve-se notar no entanto, que isto nem sempre acontece. Nalguns casos, é necessário num nível mais elevado (e.g. insulina a 5-50 $\mu\text{g/ml}$) e noutros, uma gama mais baixa (e.g., TF 0,50-50 $\mu\text{g/ml}$). Finalmente, uma preparação mais purificada dos factores polipeptídicos adicionados poderá induzir uma resposta diferente de uma forma menos pura. Em adição, a quantidade óptima de um dado factor polipeptídico adicionado ao meio poderá variar em meios diferentes, para células crescidas em substratos diferentes ou na presença de outros factores polipeptídicos.

Para meios não definidos é suficiente cultivar as células em condições tais que o factor polipeptídico esteja ausente ou inactivo (e.g. soro esgotado) (Nishikawa et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:483-487 /1975/; Kato et al Exptl. Cell Res. 130:73-81 /1981/; Mc Auslan et al. Exptl. Cell. Res. 128:95-101 /1980/; e Ross et al. Cell 14:203-210 /1978/). O crescimento das células na presença ou ausência do factor polipeptídico pode então ser medido para determinar se o factor é necessário à estimulação do crescimento ou sobrevivência. O factor polipeptídico estudado deverá ter pureza suficiente para permitir concluir com relativa certeza que é, de facto, o peptídeo conhecido que é responsável pela estimulação do crescimento.

"Região de controle" refere-se a sequências específicas nos extremos 5' e 3' dos genes eucarióticos que podem estar envolvidos no controle da transcrição ou tradução. Virtualmente todos os genes eucarióticos têm uma região rica em AT situada aproximadamente 25 a 30 bases, a montante do promotor, o sítio onde a transcrição é iniciada. Uma outra sequência encontrada 70 a 80 bases a montante do início da transcrição de muitos genes é a região CXCAAT onde X pode ser qualquer nucleotídeo. No extremo 3' da maior parte dos

genes eucarióticos está uma sequência AATAAA que pode ser o sinal para a adição da cauda poliA ao extremo 3' do mRNA transcrito.

Promotores preferidos controlando a transcrição a partir de vectores em células hospedeiras de mamíferos podem ser obtidos de várias fontes, por exemplo, de genomas de vírus tais como: políoma, Vírus Símio 40 (SV40), adenovírus, retrovírus, vírus da hepatite B e de preferência citomegalovírus ou a partir de promotores heterólogos de mamíferos, e.g. promotor da beta actina. Os promotores precoce e tardio do vírus SV40 são convenientemente obtidos como fragmento de restrição de SV40 que também contem a origem de replicação viral do SV40. Fiers et al., Nature, 273:113 (1978). O promotor precoce imediato do citomegalovírus humano é convenientemente obtido como um fragmento de restrição HindIII E. Greenaway, P.J. et al., Gene 18:355-360 (1982). Certamente, também serão úteis neste caso promotores da célula hospedeira ou de espécies relacionadas.

A transcrição de um DNA codificador de um factor polipeptídico ou proteína pretendido por eucariotas superiores é aumentada pela inserção de uma sequência potenciadora no vector. Os potenciadores são elementos do DNA que actuam em cis, geralmente cerca de 10-300 pb, e que actuam num promotor para aumentar a sua transcrição. Os potenciadores são relativamente independentes da orientação e posição tendo sido encontrados 5' (Laimins, L. et al., PNAS 78:993 /19817) e 3' (Lusky, M.L. et al., Mol. Cell Biol. 3:1108 /19837) relativamente à unidade de transcrição, dentro de um intrão (Banerji, J.L. et al., Cell 33:729 /19837) assim como dentro da própria sequência codificadora (Osborne, T.F., et al., Mol. Cell Biol. 4:1293 /19847). Muitas sequências potenciadoras são agora conhecidas a partir de genes de mamíferos (globina, elastase, albumina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, no entanto, usar-se-á um potenciador de um vírus de células eucarióticas. Exemplos incluem o potenciador do

SV40 no lado tardio da origem de replicação (pb 100-270), o potenciador do promotor precoce de eitomegalovírus, o potenciador do polioma no lado tardio da origem de replicação e os potenciadores de adenovírus.

Vectores de expressão usados em células hospedeiras eucarióticas, incluindo células hospedeiras de vertebrados, também terão sequências necessárias à terminação da transcrição que podem afectar a expressão de mRNA. Estas regiões são transcritas como segmentos poliadenilados não porção não traduzida do mRNA codificador do factor polipeptídico ou da proteína pretendida. As regiões 3' não traduzidas também incluem sítios de terminação da transcrição.

Os vectores de expressão para a expressão da proteína pretendida ou factor polipeptídico poderão conter um gene de selecção, também designado uma marca selectiva. São exemplos de tais marcas selectivas para células de mamífero a di-hidrofolato redutase (DHFR), timidina cinase ou fosfotransferase. Quando tais marcas selectivas são transferidas com êxito para uma célula hospedeira de mamífero, a célula hospedeira de mamífero transformada pode sobreviver se colocada sob pressão selectiva. Existem duas categorias ou regimes selectivos distintos. A primeira categoria baseia-se num metabolismo celular e no uso de uma linha celular mutante que não possui a capacidade para crescer independentemente de um meio suplementado. Dois exemplos são: células CHO DHFR⁻ e células LTK⁻ de ratinho. Estas células não possuem a capacidade de crescer sem a adição de tais nutrientes como sejam timidina e hipoxantina. Devido a estas células não possuírem certos genes necessários a uma via de síntese de nucleotídeos completa, não podem sobreviver a menos que os nucleotídeos que faltam sejam dados num meio suplementado. Uma alternativa no meio suplementado é a introdução de um gene DHFR ou TK nas células sem os respectivos genes, alterando assim as suas necessidades para crescimento. As células individuais que não foram transformadas com o gene DHFR ou TK não



serão capazes de sobreviver em meio não suplementado.

A segunda categoria é selecção dominante que se refere a um esquema de solução usado em qualquer tipo celular e que não necessita da utilização de uma linha mutante. Estes esquemas tipicamente usam uma droga para parar o crescimento de uma célula hospedeira. As células que têm um novo gene expressam uma proteína que confere resistência à droga e sobreviverão à selecção. Exemplos de tal selecção dominante usam as drogas neomicina, Sonthern P. e Berg, P., J. Mol. Appl. Genet. 1:327 (1982), ácido micofenólico, Mulligan, R.C. e Berg, P. Science 209:1422 (1980) ou higromicina, Sugden, B. et al., Mol. Cell. Biol. 5:410-413 (1985). Os três exemplos dados acima empregam genes bacterianos sob controle eucariótico para conferir resistência à droga adequada G418 ou neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofenólico) ou hidromicina, respectivamente.

"Amplificação" refere-se ao aumento ou replicação de uma região isolada dentro de um DNA cromossômico celular. A amplificação é conseguida usando um agente de selecção, e.g. metotrexato (MTX) que inactiva DHFR. A amplificação ou a produção de cópias sucessiva do gene DHFR resulta em maiores quantidades de DHFR produzida face às maiores quantidades de MTX. A pressão de amplificação é aplicada a presença de DHFR endógeno, através da adição de maior quantidades de MTX ao meio. A amplificação de um gene pretendido pode ser conseguida por cotransfecção de uma célula hospedeira de mamífero com um plasmídeo tendo um DNA codificador de uma proteína pretendida e o DHFR ou gene de amplificação permitindo cointegração. Asseguramo-nos de que a célula necessita de mais DHFR, necessidade essa que é satisfeita pela replicação do gene de selecção, seleccionando apenas células que podem crescer na presença de uma concentração de MTX muito elevada. Desde que o gene codificador de uma proteína heteróloga se tenha cointegrado com o gene de selecção, a replicação deste gene dá origem à replicação do gene codificador

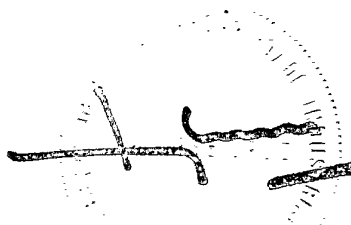


da proteína pretendida. O resultado é que um número aumentado de cópias do gene, i.e. um gene amplificador, codificando a proteína heteróloga pretendida, expressam mais das proteína heteróloga pretendida.

"Transformação" significa introdução de DNA num organismo de modo a que o DNA seja replicável, quer seja como um elemento extracromossómico quer através da integração no cromossoma. A menos que de outro modo indicado, o método aqui usado para a transformação das células hospedeiras é o método de Graham, F e van der Eb, A. Virology 52:456-457 (1973). No entanto podem também ser usados outros métodos para introdução de DNA em células como sejam injeção nuclear, fusão de protoplastos, electroporação ou lipossomas. Se se usarem células procarióticas ou células que continham uma parede celular substancial, o método de transfecção preferido é o tratamento com cálcio usando cloreto de cálcio como descrito por Cohen, F.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 69:2110 (1972).

A construção de vectores adequados contendo as sequências codificadoras e de controle pretendidas emprega técnicas convencionais de DNA recombinante. Plasmídeos isolados ou fragmentos de DNA são clivados, arranjados os extremos e religados na forma pretendida para formar os plasmídeos pretendidos.

Para análise de modo a confirmar as sequências correctas em plasmídeos construídos, as misturas de ligação são usadas para transformar E. coli K12 estirpe 294 (ATCC 31446) e os transformantes conseguidos, são seleccionados por resistência à ampicilina ou à tetraciclina conforme apropriado. Os plasmídeos dos transformantes são preparados, analisados por restrição e/ou sequenciação segundo o método de Messing et al., Nucleic Acids Res. 9:309 (1981) ou pelo método de Maxam et al., Methods in Enzymology 65:499 (1980).



"Transfecção" refere-se à internalização de um vector de expressão por uma célula hospedeira quer sejam ou não expressas de facto sequências codificadoras. São conhecidos numerosos métodos de transfecção, por exemplo CaPO_4 e electroporação. Uma transfecção com êxito é geralmente reconhecida quando qualquer indicação da operação deste vector ocorre dentro da célula hospedeira.

Para facilitar a compreensão dos exemplos que se seguem serão descritos determinados métodos e/ou termos que ocorrem frequentemente.

"Plasmídeos" são designados por uma letra minúscula p precedida e/ou seguida de letras maiúsculas e/ou números. Os plasmídeos de partida aqui usados podem ser adquiridos comercialmente, disponíveis ao público numa base não restringida ou podem ser construídos a partir de outros plasmídeos existentes de acordo com processos publicados. Em adição, plasmídeos equivalentes aos descritos são conhecidos e serão aparentes para os familiarizados com a matéria.

"Digestão" de DNA refere-se à clivagem catalítica do DNA com uma enzima de restrição que actua apenas em certas sequências do DNA. As várias enzimas de restrição aqui usadas podem ser adquiridas comercialmente e as suas condições de reacção, cofactores e outros requisitos foram usados de forma convencional. Para fins analíticos, usa-se tipicamente 1 μg de plasmídeo ou de fragmento de DNA com cerca de 2 unidades de enzima em cerca de 20 μl de solução tampão. Com a finalidade de isolar fragmentos de DNA para a construção de plasmídeos, tipicamente 5 a 50 μg de DNA são digeridos com a 20 a 25 unidades de enzima num volume maior. Os tampões e quantidades de substrato adequadas para enzimas de restrição particulares são especificadas pelo fabricante. Normalmente usam-se tempos de incubação de 1 hora a 37°C , mas pode variar de acordo com as instruções do fornecedor. Após



digestão a reacção é sujeita a electroforese directamente num gel de poliacrilamida para isolar o fragmento pretendido.

A separação dos fragmentos de clivagem de acordo com o seu tamanho é efectuada usando gel de 5 a 8 por cento de poliacrilamida descrito por Goeddel, D. et al., Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980).

"Desfosforilação" refere-se à remoção dos fosfatos terminais 5' por tratamento com fosfatase alcalina bacteriana (BAP). Como alternativa pode-se usar fosfatase alcalina de vitela em tampão de restrição BRL cove. Este processo evita que os dois extremos, obtidos por clivagem de restrição, de um fragmento de DNA, "circularizem" ou formem uma ansa fechada que impede a inserção de um outro fragmento de DNA no sítio de restrição. Os processos e reagentes para desfosforilação são os convencionais. Maniatis, T. et al., Molecular Cloning pág. 133-134 (1982). As reacções que usam BAP são efectuadas em Tris 50 mM a 68°C para inibir a actividade de quaisquer exonucleases que possam estar presentes nas preparações de enzima. As reacções decorreram durante uma hora. Após a reacção o fragmento de DNA é purificado em gel.

"Oligonucleotídeos" refere-se a um polidesoxinucleotídeo de cadeia simples ou duas cadeias de polidesoxinucleotídeo complementares que podem ser sintetizados quimicamente. Tais oligonucleotídeos sintéticos não têm fosfato 5' e portanto não se ligarão a um outro oligonucleotídeo sem adição de um fosfato com ATP na presença de uma cinase de polinucleotídeos. Um oligonucleotídeo sintético ligar-se-à a um fragmento que não tenha sido desfosforilado.

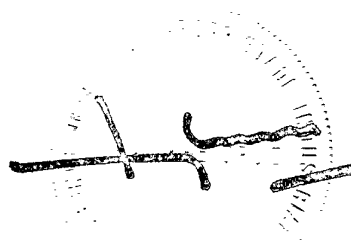
"Ligação" refere-se ao processo de formação de ligação fosfodiéster entre fragmentos de ácido nucleico de cadeia dupla (Maniatis, T. et al., Id., p. 146). A menos que de outro modo seja descrito, a ligação pode ser conseguida usando tampões e condições conhecidas com 10 unidades



de DNA-ligase de T4 ("ligase") por 0,5 µg de quantidades aproximadamente equimolares dos fragmentos de DNA a serem ligados.

"Preenchimento" refere-se a processos através dos quais o extremo de cadeia simples no extremo coesivo de um ácido nucleico cortado com uma enzima de restrição, é convertido numa cadeia dupla. Isto elimina o extremo coesivo e forma um extremo cerse. Este processo é um instrumento versátil para a conversão de um extremo cortado por restrição que pode ser coesivo com os extremos criados apenas por uma ou por várias enzimas de restrição num extremo compatível com qualquer endonuclease de restrição específica de extremos cegos ou outros extremos coesivos preenchidos. Tipicamente, o preenchimento é conseguido incubando 2-15 µg do DNA alvo em 10 mM MgCl₂, 1 mM ditiotretitol, 50 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5) a cerca de 37°C na presença de 8 unidades do fragmento Klenow da DNA-polimerase I e 250 µM de cada um dos quatro trifosfatos de desoxinucleosídeo. A incubação geralmente termina após 30 min. seguida de extracção com fenol e clorofórmio e precipitação com etanol.

As células hospedeiras são transformadas com vector(es) expressando o factor polipeptídico e a proteína pretendida e cultivadas de modo convencional. São conhecidos vários sistemas de cultura de células. Por exemplo nos sistemas de placas as células crescem aderentes a uma superfície. Podem ser usadas matrizes de suportes sólidos tais como aço inoxidável, vidro, polímeros orgânicos ou material de cerâmica contidos numa câmara de cultura. Pode-se também usar um outro sistema consistindo numa suspensão de esferas micro-veículos com células dependentes de aderência ou de células cultivadas dentro ou encerradas em matrizes de esferas em suspensões. Ainda um outro sistema é a cultura em suspensão que oferece facilidade na manipulação e potencial para aumento da escala. A escolha do sistema de cultura será feita por um entendimento na matéria tendo em consideração várias va-



riáveis, tais como: a célula hospedeira particular e se a célula é dependente de aderência; manipulação a efectuar; várias propriedades das células tais como, por exemplo, produção de ácido láctico; se a secreção é dependente de densidade; a proteína pretendida a ser produzida pela célula hospedeira; e o volume em que a cultura vai ser mantida.

Os exemplos que se seguem ilustram apenas a melhor maneira de pôr em prática o invento, mas não devem ser encarados como limitantes do mesmo.

Exemplo 1

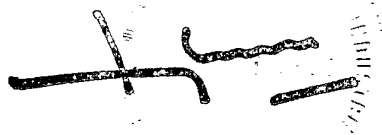
Construção do vector de expressão da proinsulina humana

O clone de cDNA do gene da insulina, pHI3, forneceu a sequência codificadora do gene da preproinsulina humana para a construção de plasmídeos para dirigir a expressão de preproinsulina em células de mamífero transfectadas. Construiu-se o vector pSVEHIGDHFR contendo o promotor do SV40, o cDNA codificador da preproinsulina humana, o sítio de poliadenilação do antigénio de superfície do vírus da hepatite B e o cDNA codificador da di-hidrofolato reductase de ratinho.

A Figura 1 mostra os passos da construção do vector de expressão da preproinsulina usado para estabelecer uma linha celular hospedeira independente da insulina. As três partes da construção de pSVEHIGDHF12 estão detalhadas abaixo:

a) pSVEHIGDHFR

1) O cDNA codificador da preproinsulina humana foi obtido num fragmento de 440 pb a partir de pHI3



por digestão com (NcoI-XhoII). pHI3 está descrito em Sures, I. et al., Science 208:57 (1980). Isolou-se o fragmento de 440 pb contendo o cDNA codificador da preproinsulina.

2) Isolou-se um fragmento XbaI-NcoI de 63 pb a partir do extremo 5' do plasmídeo do receptor da insulina (CVSE-HIRIc. 2, Publicação Europeia Nº 0192392, publicada a 17 de Agosto, 1986). Este fragmento funcionou como adaptador para fundir o extremo 5' do cDNA codificador da preproinsulina ao promotor precoce do SV40.

3) O vector, pCVSVD22/pre UK54, que fornece o "esqueleto" de plasmídeo que é ligado ao adaptador de 63 pb e às sequências codificadoras do gene preproinsulina foi preparado como descrito abaixo. pCVSVD22/pre UK54, o "esqueleto" de plasmídeo, é o produto de uma ligação de três fragmentos conforme está esquematizado na Figura 3.

i) O promotor precoce do SV40 é obtido por digestão do plasmídeo pCVSVE-HBV (Publicação do Pedido de Patente Europeia Nº 0117060, publicada em 29 de Agosto, 1984) com PvuI e XbaI.

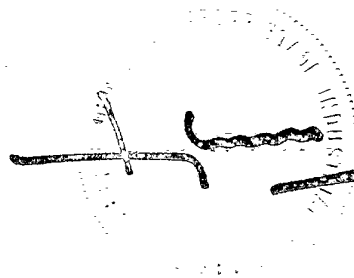
ii) O fragmento contendo o cDNA da preurocinase foi obtido a partir do plasmídeo p preUK54 trp207-I (Publicação do Pedido de Patente Europeia Nº 0092182, publicado em 26 de Outubro, 1983). O plasmídeo foi digerido com ClaI. Os extremos ClaI foram tornados cerses através de uma reacção de preenchimento. O fragmento Klenow da DNA-polimerase I mais os 4 trifosfatos de desoxirribonucleotídeos são adicionados para preencher os extremos de cadeia simples protuberantes ClaI. Após preenchimento, o DNA de plasmídeo é digerido com a segunda enzima, XbaI. Isolou-se então o fragmento XbaI-ClaI (preenchido) do cDNA de preUK54.

iii) O fragmento vector contendo a origem de replicação bacteriana, o cDNA de DHFR, a unidade de expressão eucariótica e a região 3' não traduzida do antigénio de superfície do vírus da hepatite foi obtido a partir de pEHED22 (Patente U.S Nº 4.624.918, publicada em 25 de Novembro de 1986). O plasmídeo foi primeiro cortado com BamHI. Os extremos protuberantes BamHI foram então tornados cerses numa reacção de preenchimento com DNA-polimerase I Klenow como no processo detalhado no caso da descrição de preenchimento de ClaI atrás. Após digestão com BamHI e preenchimento, o DNA foi cortado com XbaI e isolado o fragmento maior de 4,3 kb.

Estes três fragmentos foram misturados e ligados numa ligação concentrada de três fragmentos. Recuperou-se o plasmídeo recombinante pCVSVD22/preUK54. A ligação de um sítio ClaI preenchido a um sítio BamHI preenchido resulta num sítio BamHI intacto nesta junção.

Para construir pSVEHIGDHFR, pCVSVD22/preUK54 foi digerido com XbaI e BamHI e o fragmento vector isolado.

A ligação final de três partes para dar pSVEHIGDHFR usou: a) o fragmento NcoI-XhoII de 440 pb contendo o cDNA da preproinsulina; b) um fragmento XbaI-NcoI de 63 pb do pCVSVE-HIR_c-2 para ligar o cDNA ao promotor precoce do SV40; e c) o fragmento vector XbaI-BamHI de pCVSVD22/preUK54 contendo a unidade de transcrição SV40-DHFR, a marca da resistência à ampicilina origem de replicação em E. coli, o extremo 3' do antigénio de superfície do vírus da hepatite com o sítio de poliadenilação e de terminação da transcrição. Os três fragmentos foram ligados uns aos outros numa ligação concentrada de três partes e usados para transformar E. coli. Os transformantes foram analisados e o recombinante pretendido identificado.



b) pSVEHIGNeo

A Figura 2 mostra os passos para a construção do vector de expressão da preproinsulina pSVEHIGNeo.

Este vector foi construido através de uma construção de dois fragmentos. O primeiro fragmento foi um fragmento HindIII do pSVEHIGDHFR descrito acima. Estava incluído no fragmento o cDNA codificador da preproinsulina e o promotor precoce do SV40 que inicia a transcrição do DNA codificador de DHFR. O esqueleto de plasmídeo compreendendo o segundo fragmento foi obtida por digestão no sítio único HindIII imediatamente a jusante do promotor de SV40 do pSVNEOBal6 (Publicação Europeia Nº 0160457, publicado em 6 de Novembro de 1985). O plasmídeo linearizado foi então tratado com fosfatase alcalina de vitela para evitar a recircularização. O fragmento HindIII do pSVEHIGDHFR foi inserido no único sítio HindIII do pSVNEOBal6 de tal modo que o promotor do SV40 originalmente transcrevendo a unidade de transcrição SV40-DHFR de ratinho fica a montante do gene da preproinsulina. Após ligação o plasmídeo é usado para transformar células E. coli 294.

As células recombinantes são identificadas por análise de restrição para assegurar orientação correcta do fragmento contendo o cDNA da preproinsulina. Na orientação correcta o promotor do SV40 que originalmente transcreve o gene Neo bacteriano está agora a montante e inicia a transcrição do cDNA da preproinsulina.

c) pEO

Construiu-se um vector contendo o cDNA da ornitina descarboxilase (ODC) sob o controle do promotor do SV40, tendo uma sequência de poliadenilação e um gene da ampicilina para selecção em E. coli. O gene ODC endógeno pode ser amplificado em células de mamífero por selecção com o ini-

bidor de ODC, alfa difluorometilornitina (DFMO). (McConlogue, L. & Coffino, P., J. Biol. Chem. 258, 8384-8388 [1983]; McConlogue, L. & Coffino, P., J. Biol. Chem. 258:12083-12086 [1983]).

A Figura 4 mostra os passos para construção de pEO através de uma ligação de dois fragmentos.

1. Um fragmento de ODC de 1688 pb contendo toda a região codificadora de ODC foi obtido a partir de um plasmídeo contendo cDNA de ODC clonado em pBR322 (McConlogue, L. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:540-544 [1984]; Gupta, M & Coffino, P.J. Biol. Chem. 260:2941-2944 [1985]). O plasmídeo foi cortado com SalI e PvuII. Os extremos foram tornados cegos por preenchimento com Klenow e o fragmento ODC de 1688 pares de bases foi isolado num gel.

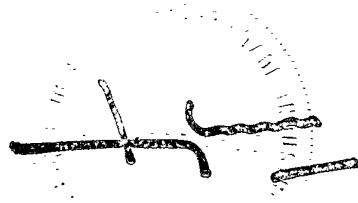
2. A partir do plasmídeo pSVPADHFR isolou-se um fragmento de 3593 pb contendo o promotor precoce do SV40, a sequência de poliadenilação da hepatite e o gene AMP para selecção em E. coli. (Publicação do Pedido de Patente Europeia Nº 0.093.619, ali referido como pETPFR que foi modificado pela adição de um fragmento de 192 pb no promotor de SV40 5' relativamente ao DNA codificador do t-PA. O fragmento adicional de 192 pb inclui um sítio HindIII extra). O plasmídeo foi cortado com HindIII e ScaII e os extremos foram preenchidos com DNA-polimerase Klenow e o fragmento 3593 isolado num gel.

Estes dois fragmentos foram então ligados numa ligação de duas partes para formar pEO. (Ver Figura 4). A orientação, e configuração dos fragmentos no plasmídeo final foi testado por análise de restrição.

Exemplo 2Seleccção de células independentes de insulina

A determinação da necessidade de factores polipeptídicos particulares, neste caso proinsulina, para uma célula hospedeira dependente de factores polipeptídicos, neste caso células CHO, foi feita suplementando meio sem insulina com proinsulina. É conhecida que a maior parte das células requerem insulina para sobreviverem em meio com soro. (Sato, G.H. et al., supra). Surpreendentemente, a proinsulina verificou-se ser um substituto da insulina no caso da célula hospedeira CHO em cultura. As células CHO/DHFR⁻ foram transfectadas com o vector da preproinsulina para dar proinsulina de modo autócrino.

Transformaram-se células CHO/DHFR⁻ com o plasmídeo pSVNeoBal6 pela precipitação com fosfato de cálcio (Simonsen, C.C. & Levinson, A.D., PNAS 80:2495-2499 [1983]) e seleccionaram-se quanto ao crescimento independente de insulina por passagem das células a baixas densidades em meio sem soro (350 m Osn), meio F-12/DME (Gibco) sem insulina (SFIF). F-12/DME compreende: glucose, 1xGHT (0,01 g/l -hipoxantina e 0,005 g/l de timidina); 10 mM HEPES; 1,0 mg/L de transferrina; micronutrientes (McKechan, W.L. et al. PNAS 72:2023 [1976]; Johnson Matheuw Chemicals); 1 μ M de ácido linoleico; 1×10^{-10} M T3 e 1×10^{-8} M hidrocortisona, estradiol e progesterona. Após duas semanas neste meio, as células sobreviventes foram recuperadas com meio contendo 5% de FBS tratado pelo calor, extraído com carvão-DEAE dextran e dialisado (ChX-FBS). As células CHO DHFR⁻ crescerão em soro total mas não em ChX-FBS a menos que seja suplementado com insulina. O ChX-FBS é, no entanto, capaz de proporcionar outros factores necessários como se pode ver pela comparação da velocidade de crescimento na presença de ChX-FBS+insulina comparado com insulina sózinha. Assim, a adição de ChX-FBS sózinho conduziria a um aumento da velocidade de replicação ("rescue")



das células que produziram a sua própria proinsulina. O processamento do soro usando extracção com carvão foi necessário para remover insulina activa. Assim, a única fonte de insulina foi a célula hospedeira transformada. As células independentes de insulina foram clonadas com base na morfologia e tamanho das colónias. Os clones foram subsequentemente testados quanto a crescimento independente de insulina em 1% ChX-FBS. Em condições com ausência de insulina a linha parental é severamente limitada na sua capacidade replicativa (1-2 divisões/semana) enquanto que os clones transformados apresentam um aumento de 30-40 vezes do número de células no mesmo período de tempo.

Dois clones que demonstraram capacidade para sobreviver e crescer em condições caracterizadas pela ausência de insulina durante períodos de tempo prolongados foram marcados DP7 e DP12, respectivamente. Estas células independentes de insulina foram ainda seleccionadas em SFIF em "spinnere" e em placas. As células colocadas em "spinners" (500 ml) foram inoculadas a 1×10^5 células/ml em SFIF. As células em placas (placas de 100 mm) foram semeadas a uma densidade de 2×10^5 células/placa 60 mm. Após quase duas semanas de selecção relativamente à independência de insulina, as células sobreviventes foram recuperadas de placas e de "spinners" com meio contendo 5% de FBS extraída e dialisada. As células das culturas em "spinner" foram retiradas naquela altura para placas. As células foram clonadas por diluição limite usando diluições seriadas. As células destas colónias foram então diluídas seriadamente para 1 célula/poço. Toda a clonagem foi feita na presença de meio F-12/DME com glucose e 5% de FBS extraído com carvão. Aproximadamente um mês mais tarde, as células que cresceram após clonagem inicial foram de novo diluídas seriadamente para uma célula/poço. Os clones que sobreviveram e cresceram foram então passados para placas de 100 mm. Estas células foram colocadas em SFIF mais 500 nM metotrexato e subcultivadas semanalmente.



Os clones DP7 e 12 demonstraram capacidade para sobreviver e crescer. Como se mostra na figura 5 as células independentes de insulina foram capazes de sobreviver e crescer num meio sem insulina enquanto que as células testemunha não o fizeram. A independência da insulina por parte das células deste invento está apresentado na figura 6. À medida que a concentração de insulina no meio é reduzida o crescimento da linha celular independente de insulina mantém-se enquanto que o número de células/placa para as células testemunha decresce com concentrações decrescentes de insulina no meio.

Exemplo 3

Produção de t-PA por uma linha celular independente da insulina

A expressão de t-PA no meio de cultura foi testada quantitativamente num radioimunoensaio. t-PA purificado e tPA traçador purificado e iodinado foram diluídos seriadamente para incluir concentração de 12,5 a 400 ng/ml em tampão fosfato salino, pH 7,3, 0,5 por cento de albumina de soro bovina, 0,01 por cento de Tween 80 e 0,02 por cento de azida de sódio. Diluições adequadas de amostras de meio a serem testadas foram adicionadas às proteínas traçadoras marcadas radioativamente. Deixou-se incubar os antígenos durante a noite à temperatura ambiente na presença de uma diluição de 1:10.000 da fracção de IgG de um anti-soro de coelho anti-tPA. O complexo anticorpo-antígeno foi precipitado por absorção a Immunobeads de cabra anti-IgG de coelho (Biorad) durante duas horas à temperatura ambiente. As esferas foram lavadas pela adição de diluente salino seguido de centrifugação durante 10 minutos a 2000xg a 4°C. Rejeitaram-se os sobrenadantes e a radioactividade nos precipitados foi controlada. As concentrações foram determinadas por comparação com o padrão referência. Mostrou-se que os vários factores polipep-

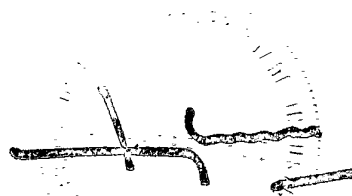


tídicos afectam a secreção de proteína assim como afectam a sobrevivência ou crescimento da célula hospedeira. Encontrou-se que factores polipeptídicos tais como hormona estimuladora do folículo (FSH), factor de crescimento epidérmico (EGF), insulina e transferrina estimulam a secreção de proteína por parte de células em cultura. (Rich, K.A. et al., *Endocrinology* 113 (6):2284 [1983]. Assim, uma célula hospedeira transformada (C2B) produtora de uma proteína pretendida, activador do plasminogénio de tecido, foi tornada independente de insulina para produção/secreção da proteína pretendida.

Para determinar se a proinsulina produzida endogenamente seria suficiente para suportar a secreção de uma proteína pretendida (e.g. tPA) de modo independente da insulina, fez-se uma transfecção de modo semelhante ao descrito no exemplo 2 mas usando uma célula hospedeira previamente transformada para expressar uma proteína pretendida, neste caso tPA. O vector, pSVEHIGNeo, descrito no exemplo 1 foi usado para transfectar a linha celular CHO contendo o tPA e DHFR amplificados (referido como C2B) (Publicação Europeia Nº 0093619). A transfecção foi feita pelo método de coprecipitação com fosfato de cálcio. (Simonsen, C.C. & Levinson, A.D., *PNAS* 80:2495-2499 [1983]; Wigler, M. et al., *PNAS* [USA] 76:1242-1255 [1979]). As células transfectadas expressando o gene Neo foram seleccionadas por crescimento em meio contendo G418.

As células C2B transfectadas com preproinsulina foram seleccionadas quanto à independência de insulina em "spinners" e placas sem soro e sem insulina (SFIF). O meio sem soro foi meio F-12/DME convencional 350mOsm sem insulina descrito atrás: glucose; 2xGHT; 10 mM Hepes; 1,0 Mg/1 transferrina; 1x micronutrientes; 1 μ M linoleico; 1×10^{-10} M T_3 e 1×10^8 M hidrocortisona, estradiol e progesterona.

Após aproximadamente duas semanas de selecção para independência de insulina, as células sobrevivem-



tes foram recuperadas de ambas as placas e "spinners" com meio contendo 5% de FBS extraído e dializado e obtiveram-se 23 clones por diluição limite. Estes clones foram testados quanto à produção de tPA em meio sem soro na ausência de insulina e na presença de concentrações variáveis de insulina (incluindo a concentração ótima de 20 $\mu\text{g/ml}$ de insulina). O clone 13 foi considerado como o meio promissor para trabalho posterior.

Um método alternativo para a criação de uma célula independente de insulina para a transfecção/selecção descrita no Exemplo 2 e imediatamente atrás é pela amplificação e ao mesmo tempo aumento da expressão de proinsulina. Assim, células C2B produtoras de tPA foram cotransfectadas com o vector pSVEHIGNeo descrito no Exemplo 1 (b) e o vector pEO do exemplo 1 (c). Isto permitiria amplificação usando DFMO após selecção. Uma metodologia semelhante de cotransfecção-coamplificação está descrito por Simonsen, C.C. e Levinson, A.D., supra.

As células C2B cotransfectadas com o vector da preproinsulina -Neo e o vector ODC, pEO, foram primeiro seleccionadas em meio contendo G418. As células resistentes a G418 foram então cultivadas com concentrações crescentes, 25, 100, 300 e 500 μM DFMO para amplificar o gene ODC transfectado e coamplificar o gene da preproinsulina. Após este processo de amplificação adicionou-se metotrexato ao meio com DFMO para manter a pressão selectiva no t-PA amplificado, a proteína pretendida. As células C2B preproinsulina transfectadas foram testadas quanto à independência da insulina em spinners e placas sem soro e sem insulina (SFIF). O meio sem soro foi meio F-12/DME convencional 35 OmOsm sem insulina descrito atrás: glucose; 2xGHT; 10 mM Hepes; 1,0 Mg/l transferri-
na;
1x micronutrientes; 1 μM linoleico; $1 \times 10^{-10}\text{M}$ T_3 e $1 \times 10^{-8}\text{M}$ hidro-
cortisona, estradiol e progesterona.



A Figura 7 mostra a produção de r-tPA por células CHO independentes de insulina e transfectadas com o gene da preproinsulina e seleccionadas e o método alternativo compreendendo transfecção com pSVEHIGNeo e amplificação. As células testemunha C2B, células C2B/clone 13 independente de insulina e o grupo amplificado de 100 μ M DFMO foram lavadas três vezes em meio SFIF e ressuspensas em meio SFIF. O clone 13 e as linhas celulares independentes de insulina 100 μ M DFMO produziram tPA na ausência de insulina com títulos equivalentes aos conseguidos pela linha celular testemunha C2B na presença de concentrações óptimas de insulina.

Exemplo 4

Construção do vector de expressão da transferrina

a) Isolamento de cDNA da transferrina humana

Preparou-se RNA mensageiro (mRNA) a partir de fígado de uma vítima de acidente, sexo masculino e adulto, por homogeneização com tiocianato de guanidina/precipitação com cloreto de lítio (Cathala, G. et al., DNA 2:329 [1983]).

Sintetizou-se DNA complementar de cadeia dupla (ds-cDNA) usando o mRNA atrás como molde e empregando um "Kit" comercial utilizando iniciação com oligo (dT) (Amersham Corporation) de acordo com as instruções do fabricante (as quais se baseiam em Okayama, H. e Berg., P., Mol. Cell. Biol. 2:161 [1982] e Gubler, U. e Hoffman, B.J., Gene 25:263 [1983]).

Os adaptadores oligonucleotídicos foram ligados a ambos os extremos do ds-cDNA de extremos cerses como se mostra:



ds-cDNA

- - - - - GGTCTGACGAGCTCGAG

- - - - - + CCAGCTGCTCGAGCTCTTAA

SalI SstI EcoRI

XhoI

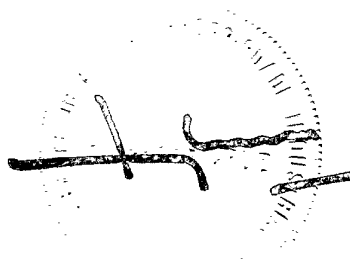
dando ds-cDNA terminando em sítios de restrição EcoRI:

O ds-cDNA foi fraccionado por electrofo-
rese em gel de poliacrilamida e o ds-cDNA migrando acima de
2000 pares de bases foi recuperado do gel por electroforese.
O ds-cDNA fraccionado de acordo com o tamanho foi ligado ao
vector gt10 do fago lambda (Hyunh, T.V. et al., em DNA Clo-
ning Techniques, A Pratical Approachs, D. Glover (ed) [IRL
Press, Osford, 1985] que tinha sido cortado com EcoRI e empa-
cotado usando um extracto de empacotamento comercial para o
bacteriófago lambda (Stratagene).

Os bacteriofagos empacotados foram semea-
dos em E. coli estirpe C600 hfl⁻ (Hyunh, T.V. et al. Cons-
truction and Screening cDNA Libraries in λ gt10 and λ gt11
em DNA Cloning ed. Glover, D.M., [IRL Press Oxford, Washin-
gton, D.C.7 [1985] e o DNA bacteriofagico foi transferido
para filtros de nitrocelulose (Maniatis, T. et al. Molecular
Cloning: A Laboratory Manual, [Cold Spring Harbour Labora-
tory, 1982]).

b) Identificação de clones recombinantes contendo o cDNA da
transferrina

Seis dos filtros de nitrocelulose foram
despistados com o oligonucleotídeo sintético mostrado abaixo.
A sua sequência foi projectada de modo a hibridar com a se-
quência do dCNA da transferrina humana desde o nucleotídeo
110 ao # 75 conforme descrito por Yang et al. Proc. Natl.



Acad. Sci. /USA_7 81:2752-2756 (1984).

5' GTG TGC AGT GTC GGA GCA TGA GGC CAC TAA GTG CCA GAG-
TTT CCG CGA CCC TAT GAA AAG CGT CA 3'

O oligonucleotídeo foi marcado radioativamente pela adição de um grupo fosfato radioactivo ao extremo 5' do oligonucleotídeo numa reacção convencional de fosforilação (Maniatis, T. et al., supra at125). A hibridação foi efectuada como descrito por Maniatis, (Ibid pág. 326) usando 30% de formamida no tampão de hibridação. As placas que deram hibridação positiva foram identificadas usando autorradiografia (Maniatis, Ibid. pág. 326) e seis colónias fágicas individuais foram picadas para purificação (Maniatis, Ibid pág. 64).

O fago de cada uma das placas foi novamente semeado a baixa densidade e após uma fase de crescimento de 16 horas o DNA bacteriofágico foi novamente transferido para filtros de nitrocelulose. Estes filtros foram testados como descrito acima usando a mesma sonda oligonucleotídica. Uma única placa isolada foi picada de cada uma das seis placas. Estes fagos foram usados para infectar uma cultura de uma estirpe susceptível de E. coli, c600 hFI⁻ (Hyunh, T.V. et al., supra).

Preparou-se DNA fágico a partir de cada um dos seis clones usando uma preparação padrão de fagos em pequenas escala (Maniatis Ibid pág 373).

Digeriu-se 40 µg de DNA de cada um dos clones com a enzima de restrição SstI (Goff, S.P. e Rambachs, A., Gene 3:347 /1978_7). Estes produtos de digestão foram aplicados em géis de 1% de agarose de baixo ponto de fusão (Struhl, K., Biotechniques 3: 452 /1985_7). Três dos clones mostraram inserções com aproximadamente o tamanho correcto, 2,3 kb (Yang et al., supra). As bandas da inserção foram re-

tiradas dos géis e subclonadas (Struhl, supra) no vector mp19 baseado em M13 (Yanish-Perron et al., Gene 33:103-119 /1985/ e Norrander, J. et al., Gene 26:101 /1983/7). Os clones fágicos recombinantes (placas brancas) foram repicados e os extremos sequenciados.

Um dos clones mostrou identidade perfeita da região codificadora com a sequência publicada da transferrina (Yang et al., supra). A inserção deste clone foi subclonada (Struhl, supra) em pUC19 (Yanish-Perron, supra) no sítio SstI. Os clones recombinantes foram identificados como colónias brancas em placas contendo transferrina-gal (Yanish-Perron, supra). O DNA de plasmídeo foi purificado a partir de um clone isolado em que a região codificadora da transferrina estava orientada na direcção oposta à região do promotor lacZ.

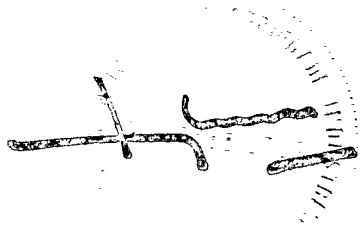
A região codificadora da transferrina foi retirada do vector pUC como um fragmento EcoRI-XbaI de 2,3 kb a partir de uma digestão parcial com XbaI-EcoRI. Este fragmento único foi purificado a partir de um gel de 1% de agarose de baixo ponto de fusão e subclonado (Struhl, supra) num vector pRK5 digerido com EcoRI-XbaI. A construção deste vector está descrita abaixo e na figura 9.

pRK5 é então digerido com EcoRI-XbaI produzindo assim um sitio para inserção do fragmento de 2,3 kb EcoRI-XbaI que codifica para a transferrina. Este fragmento é então inserido, criando o pRKTFN mostrado na fig. 8.

c) Construção do pRK5

O plasmídeo inicial pCIS2.8c28D (ver European publication Number 272929) foi construído da seguinte forma.

Uma variante referida como a 90Kd/73 kd



exacto que compreende os aminoácidos 1 a 740 e 1690 a 2332 do Factor VIII foi feita. Esta variante compreende uma subunidade de 90Kd ligada a uma subunidade de 73Kd. A 90Kd compreende os aminoácidos 1 a 740 e a 73Kd os aminoácidos 1690-2332.

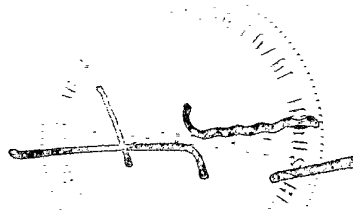
O vector de expressão que codifica o factor VIII predecessor foi feito. O plasmideo faz desaparecer o dominio B do factor VIII. A proteína de fusão mais pequena (90Kd/73Kd exacta) contem somente os pontos do factor VIII requeridos para uma actividade funcional máxima, Eaton, D.E. et al., Biochemistry 25:505-512 (1982).

Esta proteína de fusão foi expressa no sistema do vector CIS que é eficiente para a expressão do factor VIII de comprimento total, com uma diferença. Como mostra a Figura 10, um unico nucleotido que precede o sitio ClaI em pF8Cis, foi trocado de guanidina para timidina de tal modo que uma estirpe de E. coli dam⁺ deixa de ser requerida para o corte no sitio ClaI.

Uma ligação de três partes que compreende os seguintes fragmentos foi levada a cabo: a) O fragmento ClaI-SstII de 12617 pb de pF8Cis (isolado a partir de uma estirpe dam⁻ e tratado com BAP); b) o fragmento SstII-PstI de 216 pb de pF8Cis e; c) um curto oligonucleotídeo sintético PstI-ClaI foi tratado com cinase (ver a Figura 10; o asterisco indica o nucleotídeo trocado).

A Figura 10 também mostra a subclonagem dos fragmentos de 408 pb BamHI-HindIII e de 416 pb BamHI-PstI de pSVEFVIII (European Patent Publication Nº 160.457) que contêm as regiões 5' e 3' do DNA do factor VIII a ser fundido para criar a variante.

A figura 11 mostra uma ligação de três partes usada para construir a variante de fusão do factor VIII.



Dois fragmentos diferentes, A e B, são clonados no mesmo vetor pUC118 BamHI-PstI BAP. O fragmento A é o fragmento BamHI-HindIII de 408 pb de pUC408BH. O fragmento B inclui um oligonucleotídeo que contém a região de fusão. O oligonucleotídeo de cadeia dupla é mostrado na Figura 11. Enquanto a sequência completa de DNA nos sítios de restrição terminais é dado na Figura 11, os oligonucleotídeos reais não incluem as bases delineadas pelas linhas nos sítios de restrição. Estes oligonucleotídeos foram usados sem o tratamento com cinase para evitar a polimerização durante a ligação.

Para o pUC.8d28 o fragmento B foi um oligonucleotídeo HindIII-PstI mostrado na Figura 11.

Após a ligação dos fragmentos A e B ao vector, como mostra a Figura 11, as sequências de junção esperadas foram confirmadas por sequenciação do DNA das regiões circundadas pelos oligonucleotídeos.

A variante do plasmídeo de expressão foi construído, como mostra a Figura 12, com uma ligação de quatro partes. O plasmídeo de fusão da Figura 11 foi cortado com BamHI e PstI e os fragmentos de 443 e 606 pb foram isolados. Os três fragmentos restantes das ligações de quatro partes foram: 1) 1944 pb ClaI-BamHI de pSVEFVIII (European Patent Publication Nº 160.457); 2) o fragmento de 2202 pb BamHI-XbaI de pSVEFVIII foi parcialmente digerido com PstI e o isolado o fragmento criado de 1786 pb PstI-XhoI e 3) o fragmento de 5828 pb XbaI-ClaI BAP de pCis2.8e24D da Figura 10.

Os números de bases nos parágrafos 1 a 6 referem-se a pCIS2.8c.28D com a base um do primeiro T do sítio EcoRI precedendo o promotor de CMV. O promotor precoce e intrão do citomegalovírus e a origem do SV40 e o sinal poliA foram colocados em plasmídeos separados.



1. O promotor precoce do citomegalovirus foi clonado como um fragmento EcoRI de pCIS2.8c.28D (9999-1201) no sítio EcoRI de pUC118 (Yanish-Perron et al., Gene 33:103 /19857). Repicaram-se doze colónias e testaram-se quanto à orientação em que o DNA de cadeia simples feito a partir de pUC118 permitiria sequenciação a partir do sítio EcoRI em 1201 até ao sítio EcoRI em 9999. Este clone foi designado pCMVE/P.
2. DNA de cadeia simples feito a partir de pCMVE/P de modo a inserir um promotor SP6 (Green, M.R. et al., Cell 32:681-694 /1983_7) por mutagénese dirigida. Um 110 mero sintético contendo o promotor SP6 (Ver Nucleic Acids Res. 12:7041 /1984_7 figura 1; sequências de -69 a +5 do promotor SP6 foi usado juntamente com fragmentos de 18 pb em qualquer um dos extremos do oligómero correspondente às sequências CMVE/P. A mutagénese foi feita por técnicas convencionais e testada usando um 110 mero marcado com restringência alta e baixa. Seis clones potenciais foram repicados e sequenciados. Identificou-se um clone positivo que se designou pCMVE/PEP6.
3. O promotor SP6 foi testado e verificou-se estar activo, por exemplo, pela adição de RNA-polimerase SP6 e testando quanto ao RNA de tamanho adequado.
4. Fez-se um adaptador Cla-NotI-Sma para ser inserido do sítio ClaI (912) ao sítio SmaI de pUC118 em pCMVE/P (passo 1) e pCMVE/PSP6 (passo 2). Este adaptador foi ligado ao sítio ClaI-SmaI de pUC118 e testado quanto aos clones correctos. O adaptador foi sequenciado em ambos e os clones foram designados pCMVE/PSP6-L e pCMVE/P-L.
5. pCMVE/PSP6-L foi cortado com SmaI (na junção adaptador/pUC118) e HindIII (em pUC118). Um fragmento HpaI (6573) a HindIII (6136) do pSVORAA Δ RI 11, descrito abaixo, foi inserido em SmaI-HindIII de pCMVE/PSP6-L. Esta

ligação foi testada e isolado um clone que se designou pCMVE/
/PSP6-L-SVORAA Δ RI.

a) A origem do SV40 e o sinal poliA isolado como um fragmento XmnI(5475)-HindIII(6136) de pCIS2.8c28D e clonado nos sítios HindIII a SmaI de pUC119. Este foi designado pSVORAA.

b) O sítio EcoRI em 5716 foi removido por digestão parcial com EcoRI e preenchimento com Klenow. As colónias obtidas a partir de auto-ligação após preenchimento foram testadas e o clone correcto foi isolado e designado pSVORAA Δ RI 11. A eliminação do sítio EcoRI foi testada por sequenciação e verificou-se estar correcta.

c) O fragmento HpaI(5573) a HindIII(6136) de pSVORAA Δ RI 11 foi isolado e inserido em pCMVE/PSP6-L (ver 4 acima).

6. pCMVE/PSP6-L-SVORAA Δ RI (passo 5) foi cortado com EcoRI em 9999, dotado de extremos cegos e auto-ligado. Um clone sem um sítio EcoRI foi identificado e designado pRK.

7. pRK foi cortado com SmaI e BamHI. Este foi preenchido com Klenow e religado. Testaram-se as colónias. Identificou-se um clone positivo e designou-se pRK Δ Bam/Sma3.

8. O sítio HindIII foi convertido num sítio HpaI usando um conversor. (Um conversor é um fragmento de DNA usado para trocar um sítio de restrição por outro. Neste caso um extremo seria complementar de um extremo coesivo HindIII e

no outro extremo tem um sítio de reconhecimento para HpaI). Identificou-se um clone positivo e designou-se pRK Bam/Sma, HIII-HpaI 1.

9. pRK Δ Bam/Sma, HIII HpaI 1 foi cortado com PstI e NotI e um adaptador RI-HIII e um adaptador HIII-RI foram ligados. Encontraram-se clones para cada um dos adaptadores. No entanto, foi também determinado que muitos dos conversores HpaI foram inscritos (dois ou mais conversores geraram um sítio PvuII). Portanto, estes clones tiveram de ser cortados com HpaI e auto-ligados.

10. O clone RI-HIII 3 e o clone HIII-RI 5 foram cortados com HpaI, diluídos e auto-ligados. Identificaram-se clones positivos. O clone RI-HIII foi designado pRK5.

Exemplo 5

Seleccção de células independentes de transferrina

Células DP7 independentes de insulina foram transfectadas com pRKTFN descrito no exemplo 4 acima. A transfecção foi feita pelo método do coprecipitação com fosfato de cálcio de Simonsen e Levinson, supra. As células transfectadas foram seleccionadas quanto à resistência à higromicina. O conjunto de células resistentes à higromicina foi clonado e várias colónias repicadas. A clonagem decresce a possibilidade de cruzamento de células não produtoras no passo de selecção subsequente. As linhas celulares que produzem transferrina são seleccionadas por crescimento dos clones atrás num meio F-12/DME sem soro (350m Osm) e sem transferrina. F-12/DME está descrito atrás excepto não se ter adicionado ferro. No entanto, nestas condições o ferro é introduzido como contaminante de outros componentes domeio

(e.g. água, NaCl, etc.). Esta pequena quantidade de ferro é insuficiente para suportar um crescimento celular óptimo na ausência de transferrina, mas pode suportar o crescimento celular na presença de transferrina (Mather, J.P. e Sato, G.H., Exptl. Cell Res. 120:191-200 [1979]; Perez-Infante, U. e Mather, J.P., Exptl. Cell Res. 142:325-332 [1982]) presumivelmente devido a uma maior eficácia da tomada de ferro via sistema, transferrina-receptor. As células que sobreviveram durante 1-2 semanas neste meio sem soro/sem transferrina-ferro foram então recuperadas com meio F-12/DME contendo 5% de FBS extraído. Os clones são subsequentemente testados quanto à independência de transferrina, por comparação do crescimento dos clones e da linha parental não transfectada em meio com baixo teor de ferro com e sem adição de transferrina humana. Os clones com capacidade para sobreviver e crescer quando colocados em condições sem transferrina-ferro foram seleccionados ainda em "spinners" e placas.

Os clones independentes de transferrina seleccionados foram subsequentemente testados quanto à independência de insulina por comparação do crescimento daqueles clones e linhas não transfectadas em meio sem soro, sem insulina, sem transferrina e com baixo teor de ferro com e sem insulina e transferrina.

REIVINDICAÇÕES

1a. - Método para cultura de uma célula hospedeira caracterizado por:

- a. se determinar um factor polipeptídico para uma célula hospedeira dependente de factores polipeptídicos;
- b. se transformar a referida célula hospedeira com ácido nucleico codificador do referido factor polipeptídico;
- c. se transformar a célula hospedeira com ácido nucleico codificador de uma proteína pretendida; e
- d. se cultivar as células transformadas do passo (c) num meio sem o factor polipeptídico.

2a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender adicionalmente o passo de recuperação da proteína pretendida.

3a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o meio ser meio sem soro.

4a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a célula hospedeira ser uma célula hospedeira de vertebrado.

5a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a célula hospedeira ser uma célula de ovário de hamster chinês.

6a. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o factor polipeptídico ser proinsulina.

88.479



7ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o factor polipeptídico ser transferrina.

8ª. - Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o factor polipeptídico ser transferrina e insulina.

9ª. - Célula hospedeira caracterizada por ser transformada para expressar uma proteína pretendida e um factor polipeptídico.

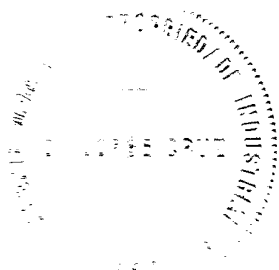
10ª. - Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 9, caracterizada por ser uma célula de vertebrado.

11ª. - Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 9, caracterizada por ser uma célula de ovário de hamster chinês.

12ª. - Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 11, caracterizada por o factor polipeptídico ser proinsulina.

13ª. - Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 9, caracterizada por ser uma célula da linha de rim embrionário humano.

14ª. - Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 9, caracterizada por o factor polipeptídico ser proinsulina.



15a. - Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 9 caracterizado por o factor polipeptidico ser a transferrina.

16a. - Cultura caracterizada por compreender a célula hospedeira da reivindicação 9 e um meio sem o factor polipeptidico expresso pela referida célula hospedeira.

17a. - Cultura de acordo com a reivindicação 16 caracterizado por o meio ser um meio sem soro.

18a. - Cultura de acordo com a reivindicação 16 caracterizado por o factor polipeptidico ausente do meio ser a insulina.

Lisboa, 12 de Setembro de 1988

J. PEREIRA DA CRUZ
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 10-A, 1.º
1200 LISBOA

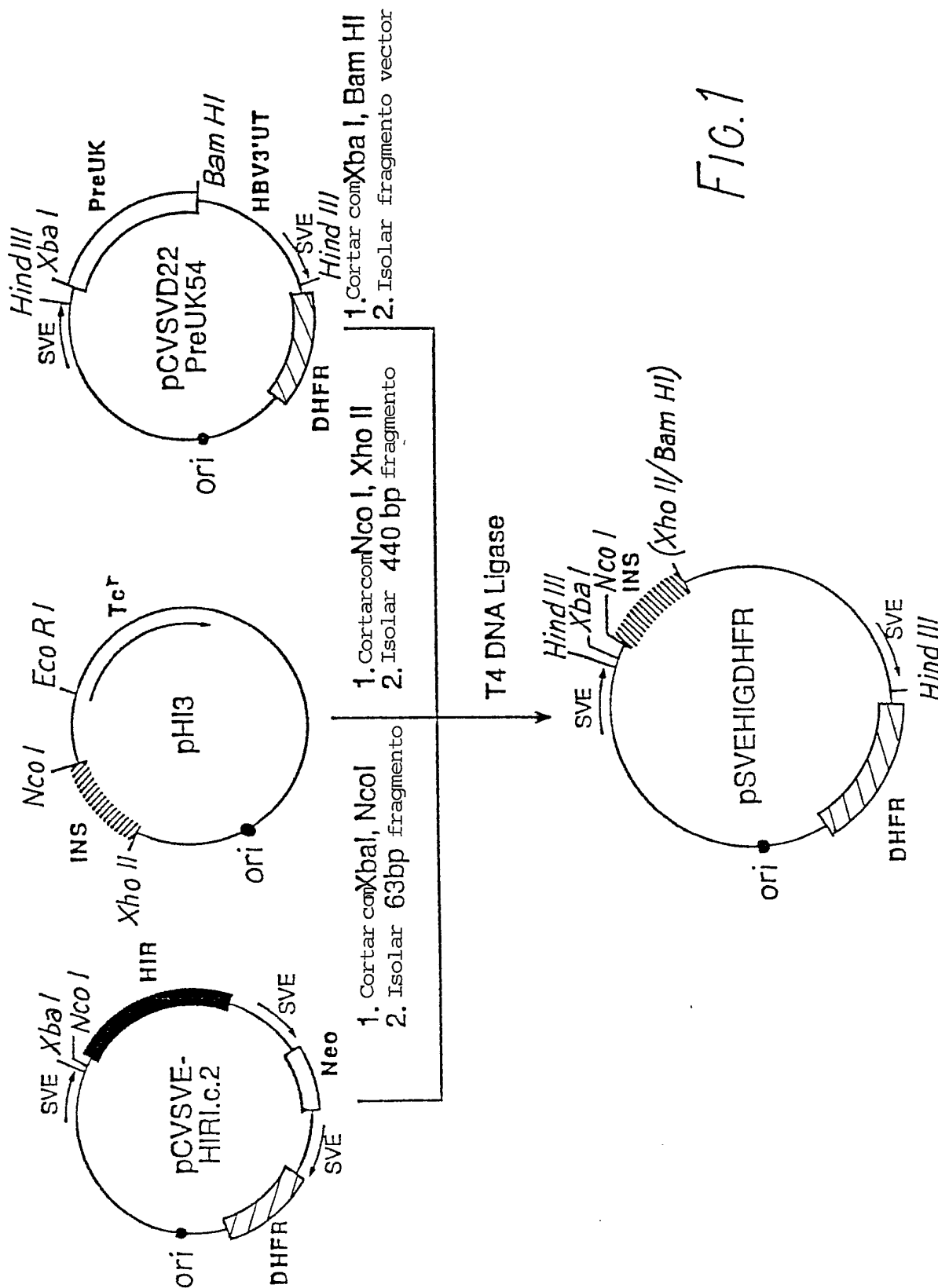


FIG.1

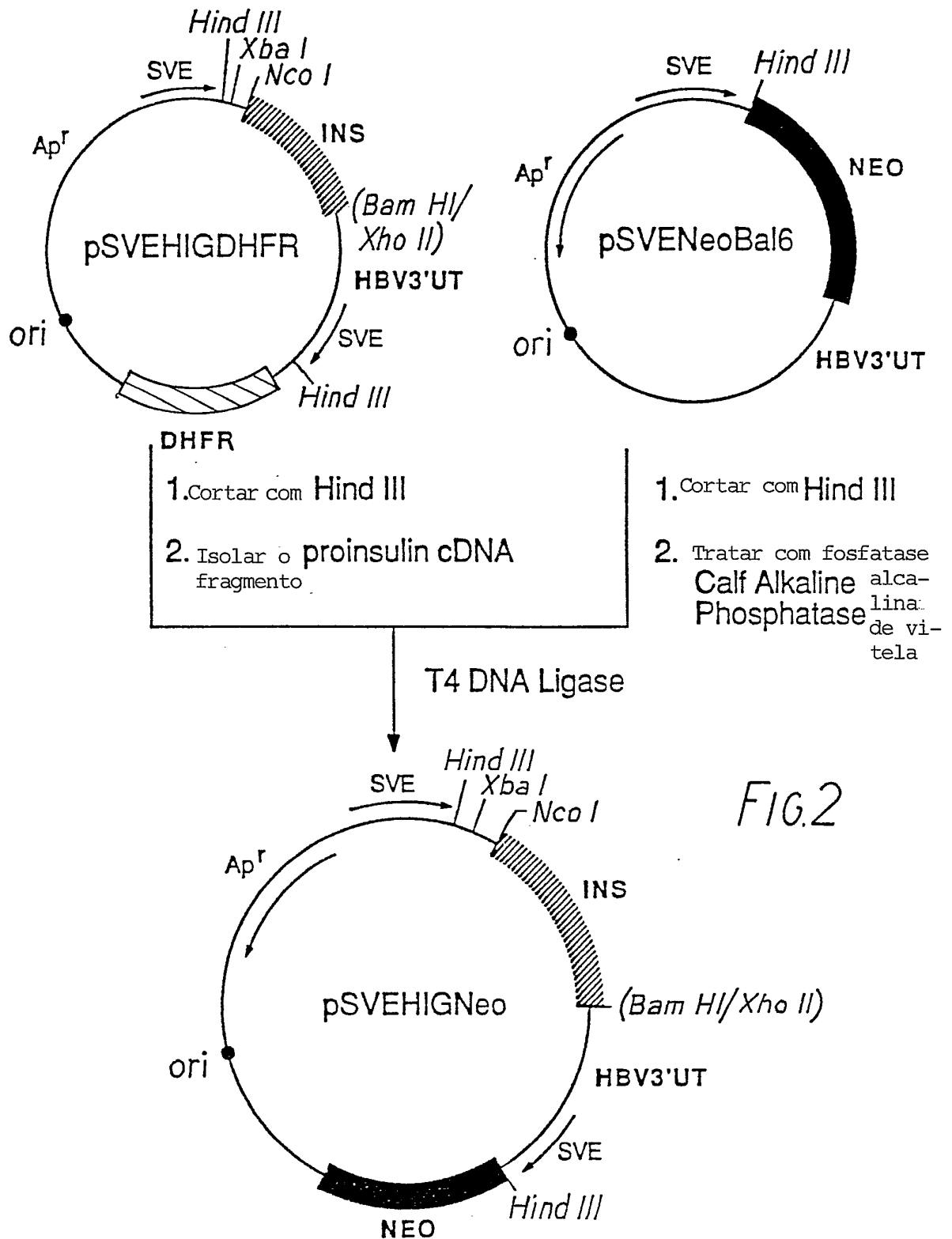
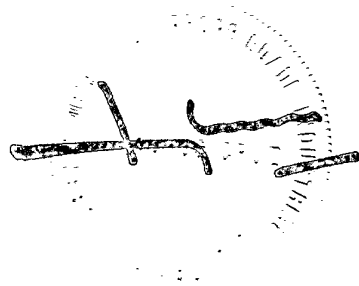
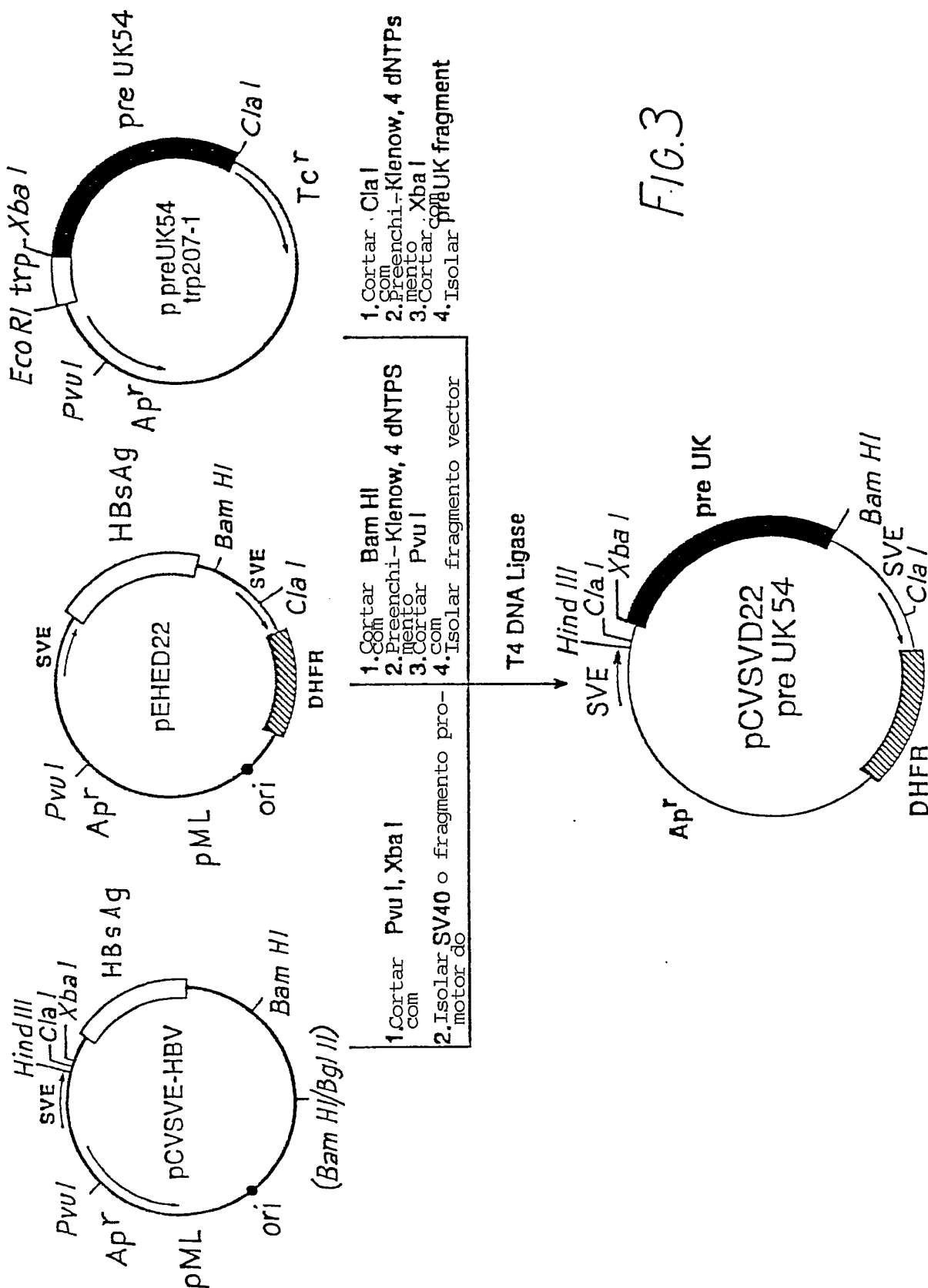


FIG.2



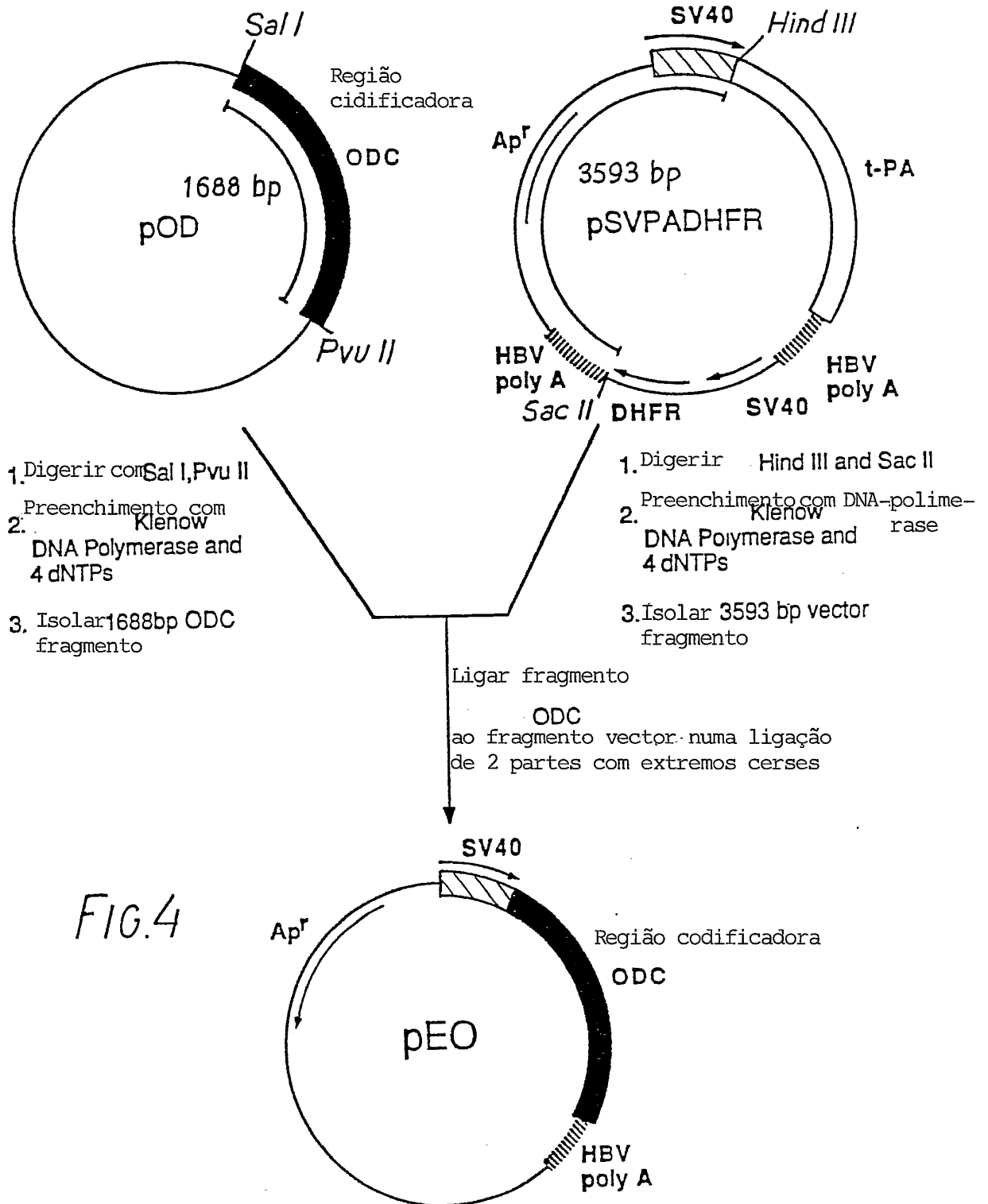
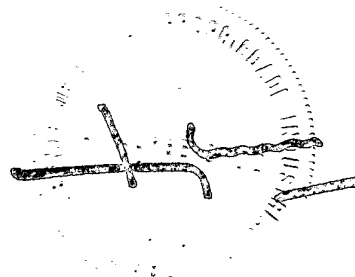
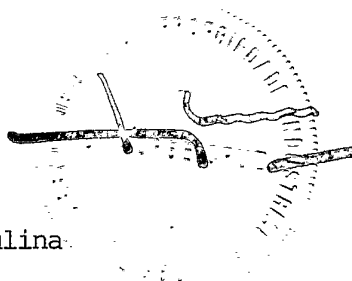
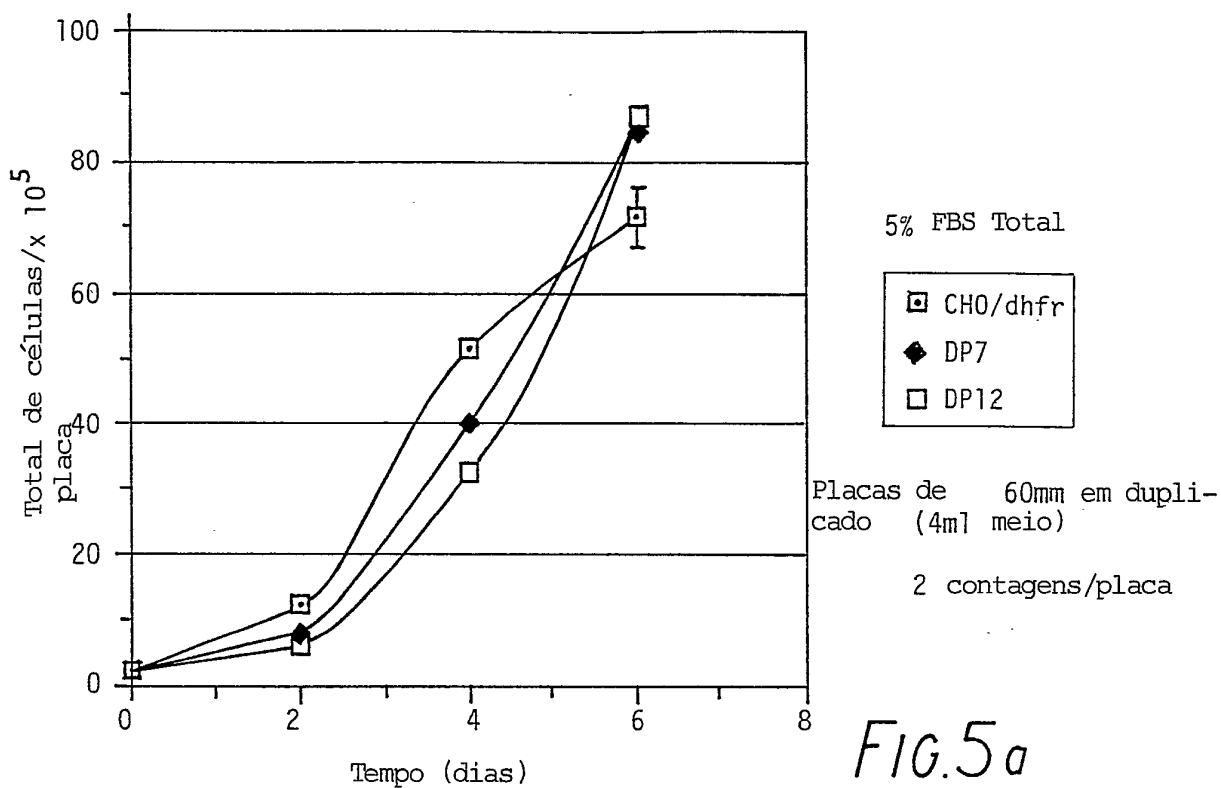


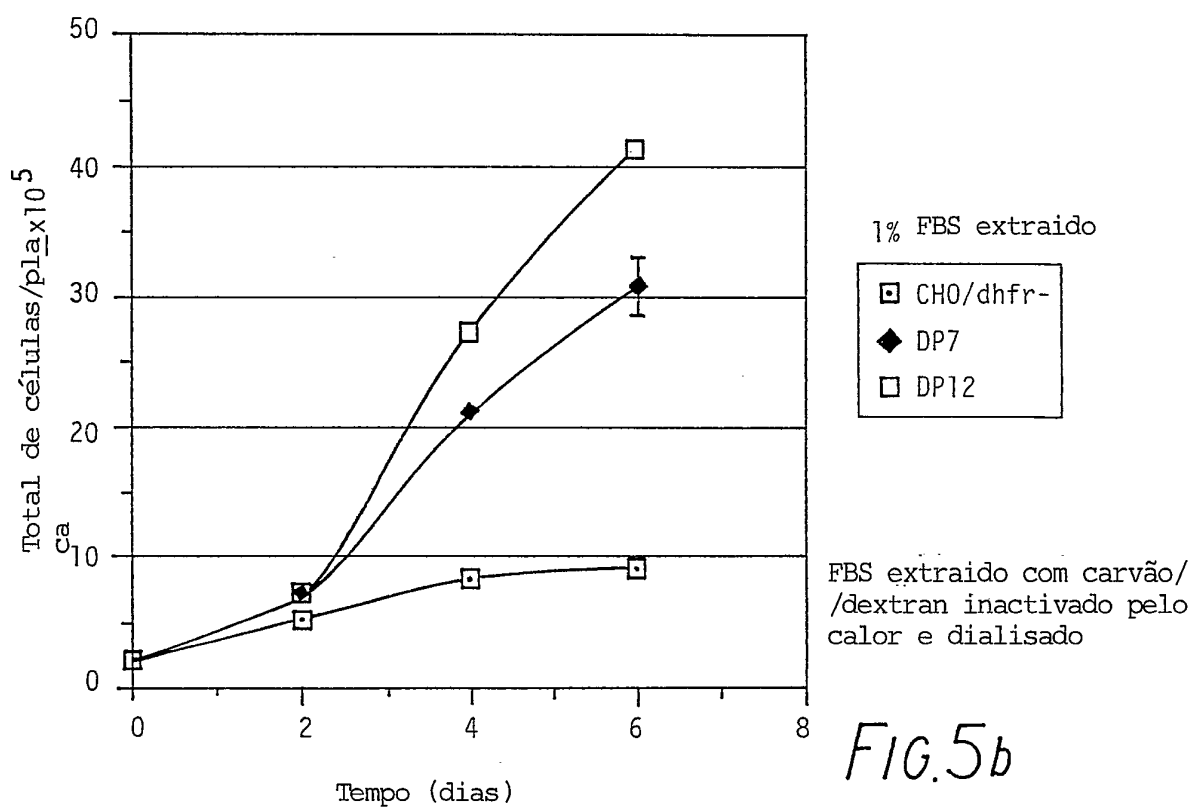
FIG.4

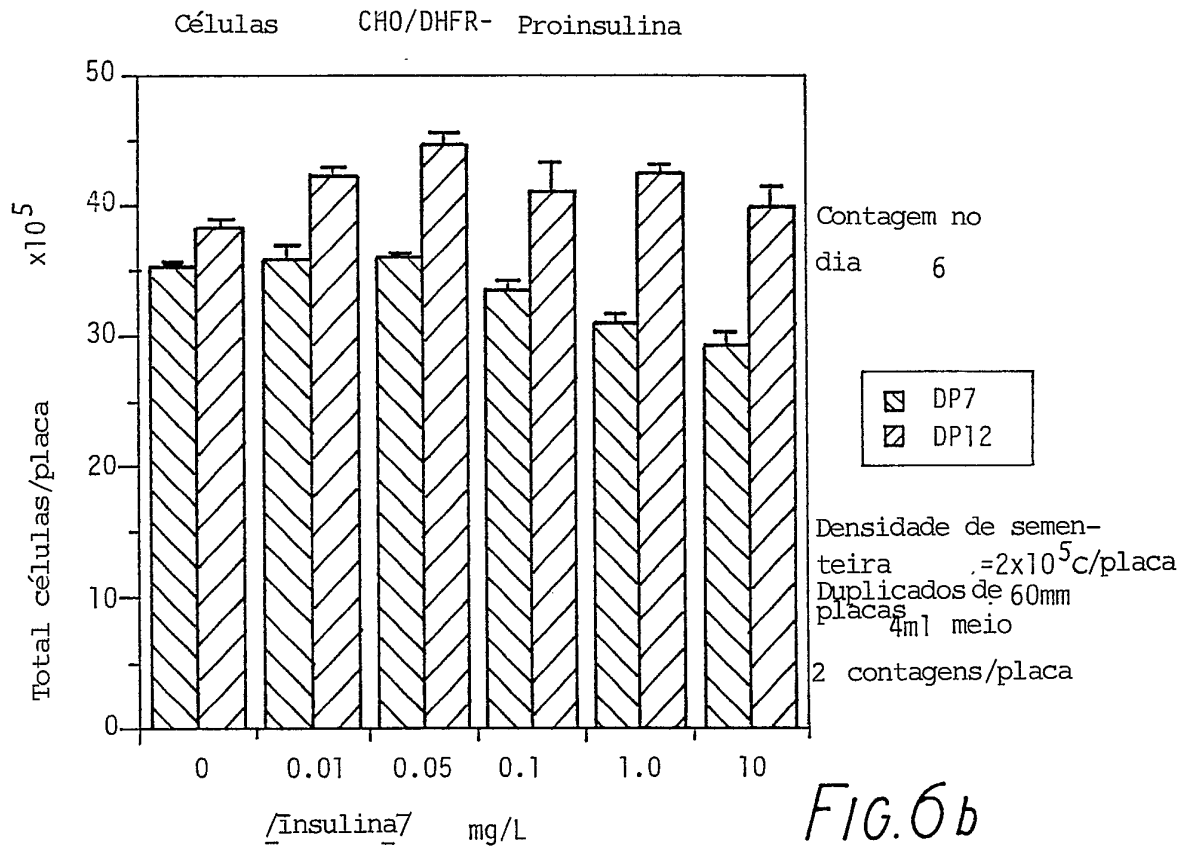
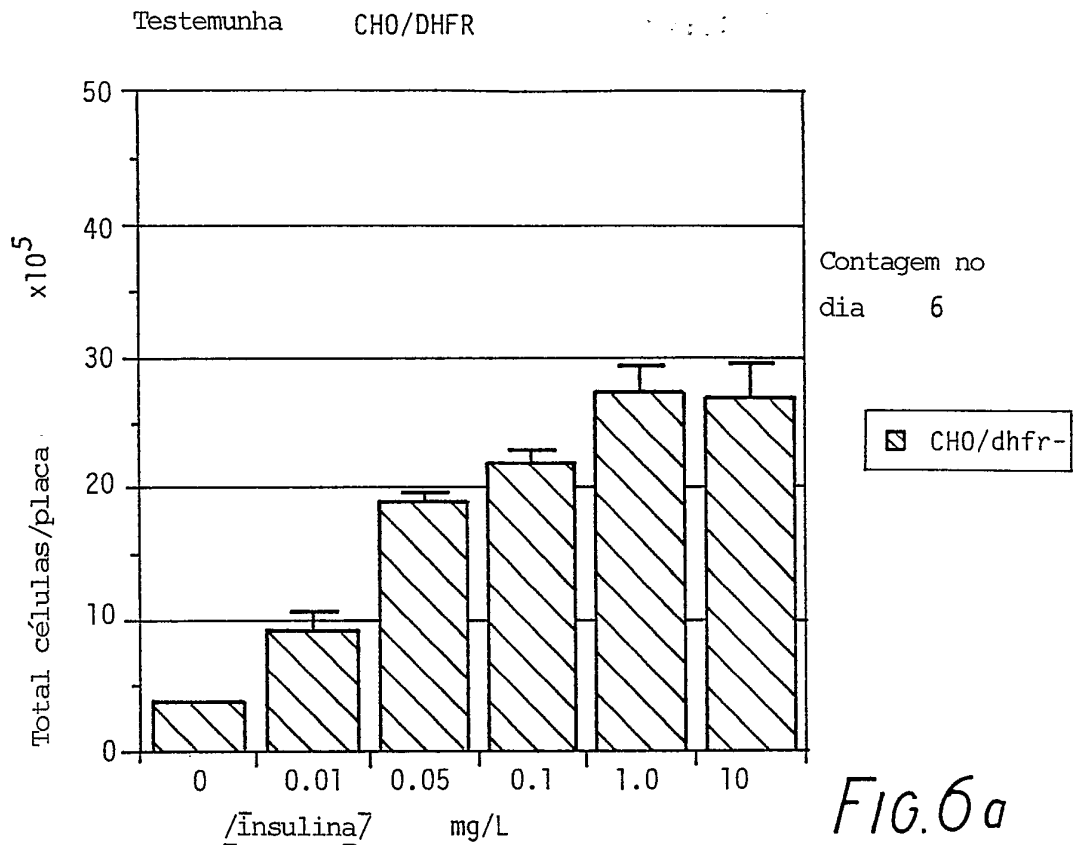
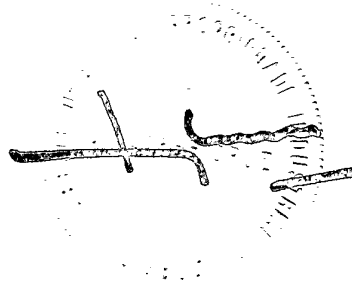


Células CHO/DHFR-/ Proinsulina

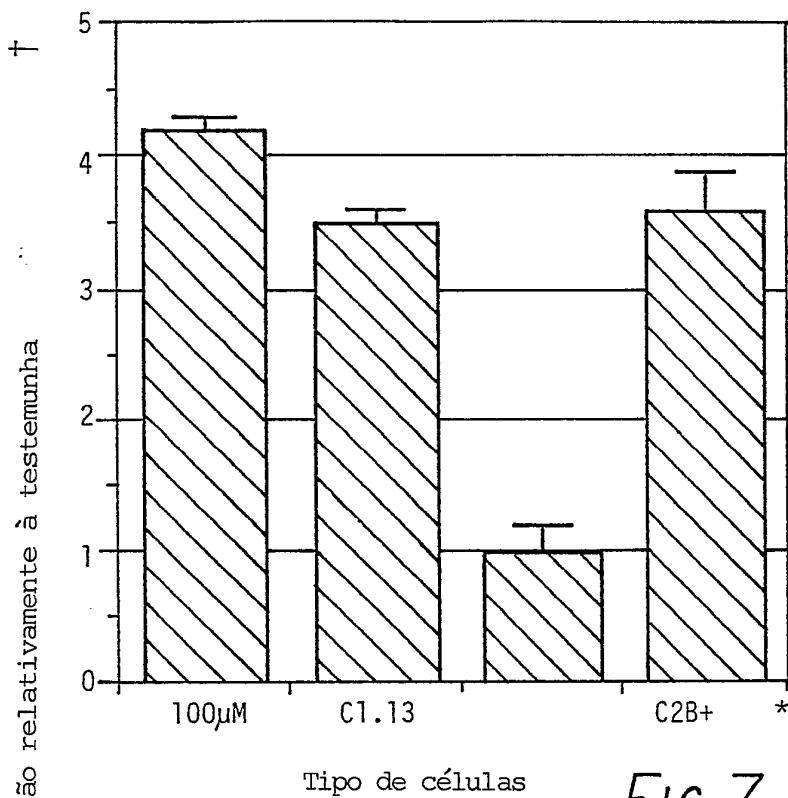


Células CHO/DHFR-/ Proinsulina





Células C2B- Proinsulina



† produtividade relativa

* 20 µg/ml de insulina

FIG.7

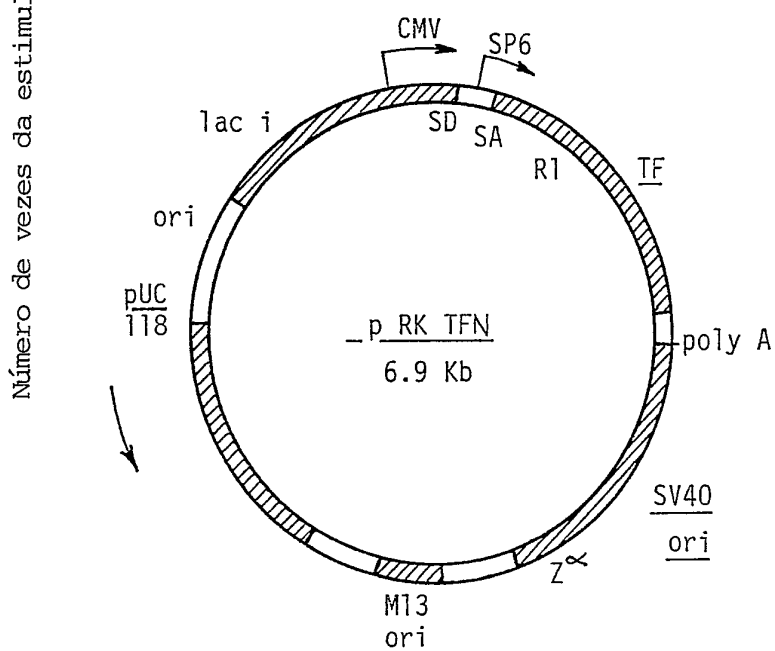


FIG.8

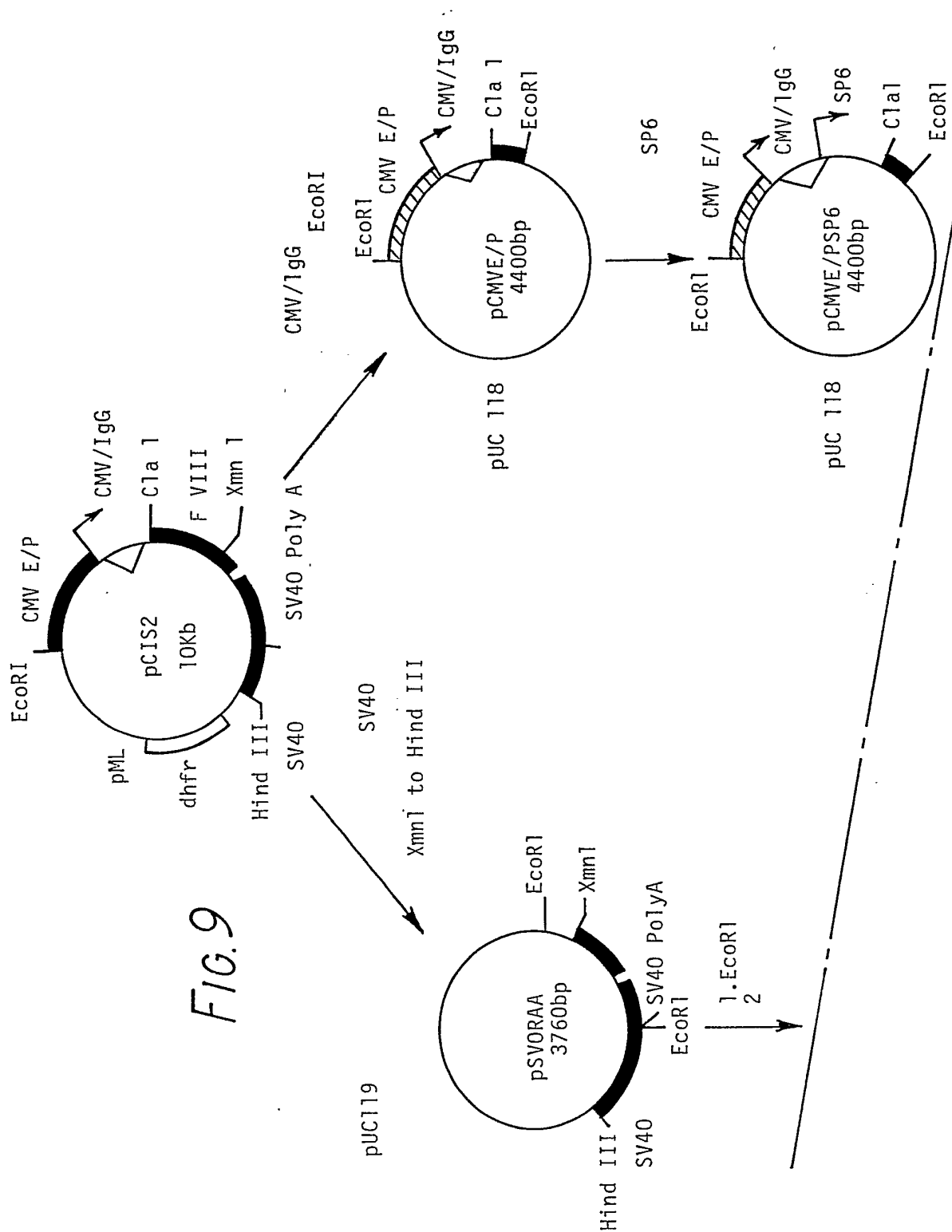


FIG. 9

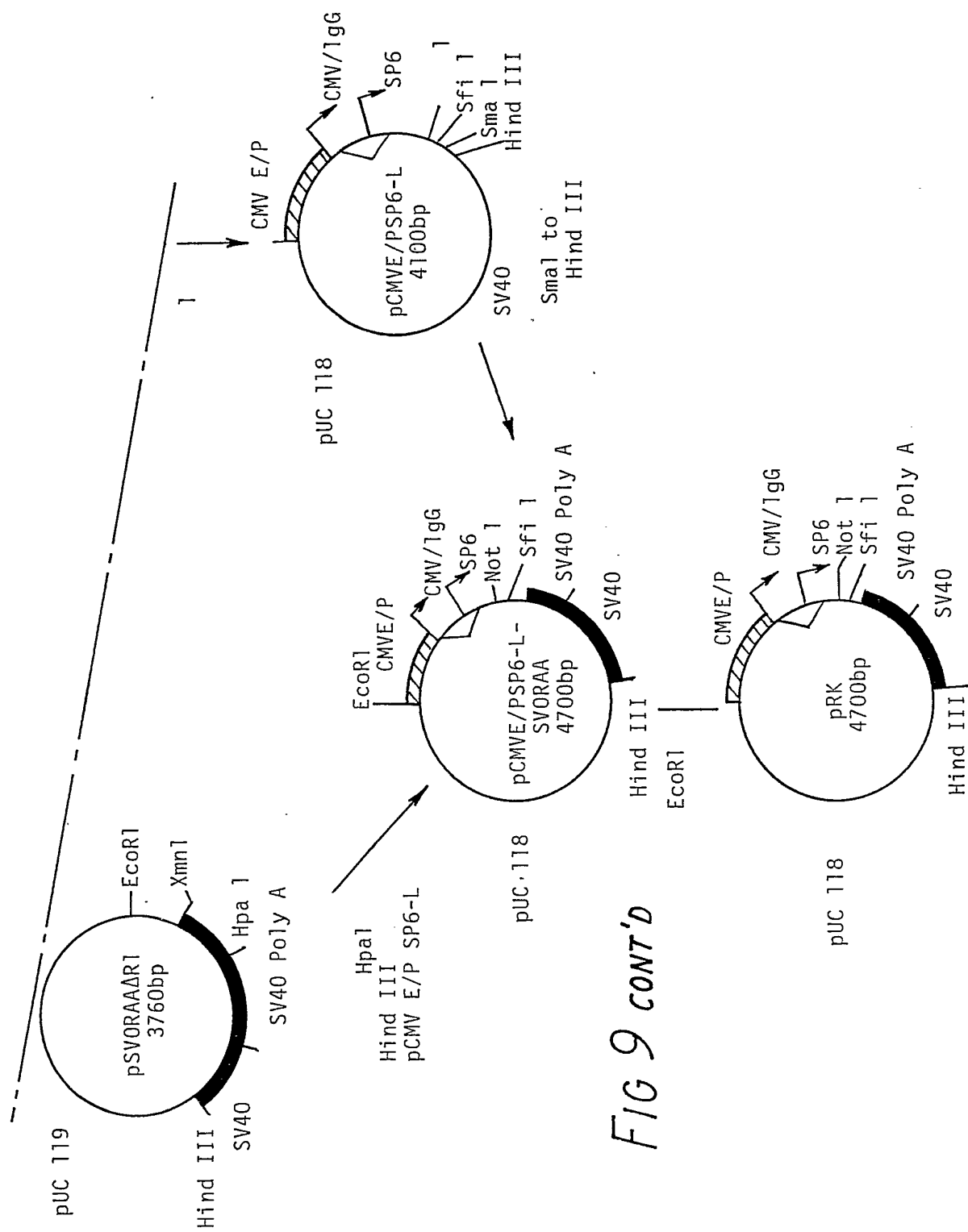
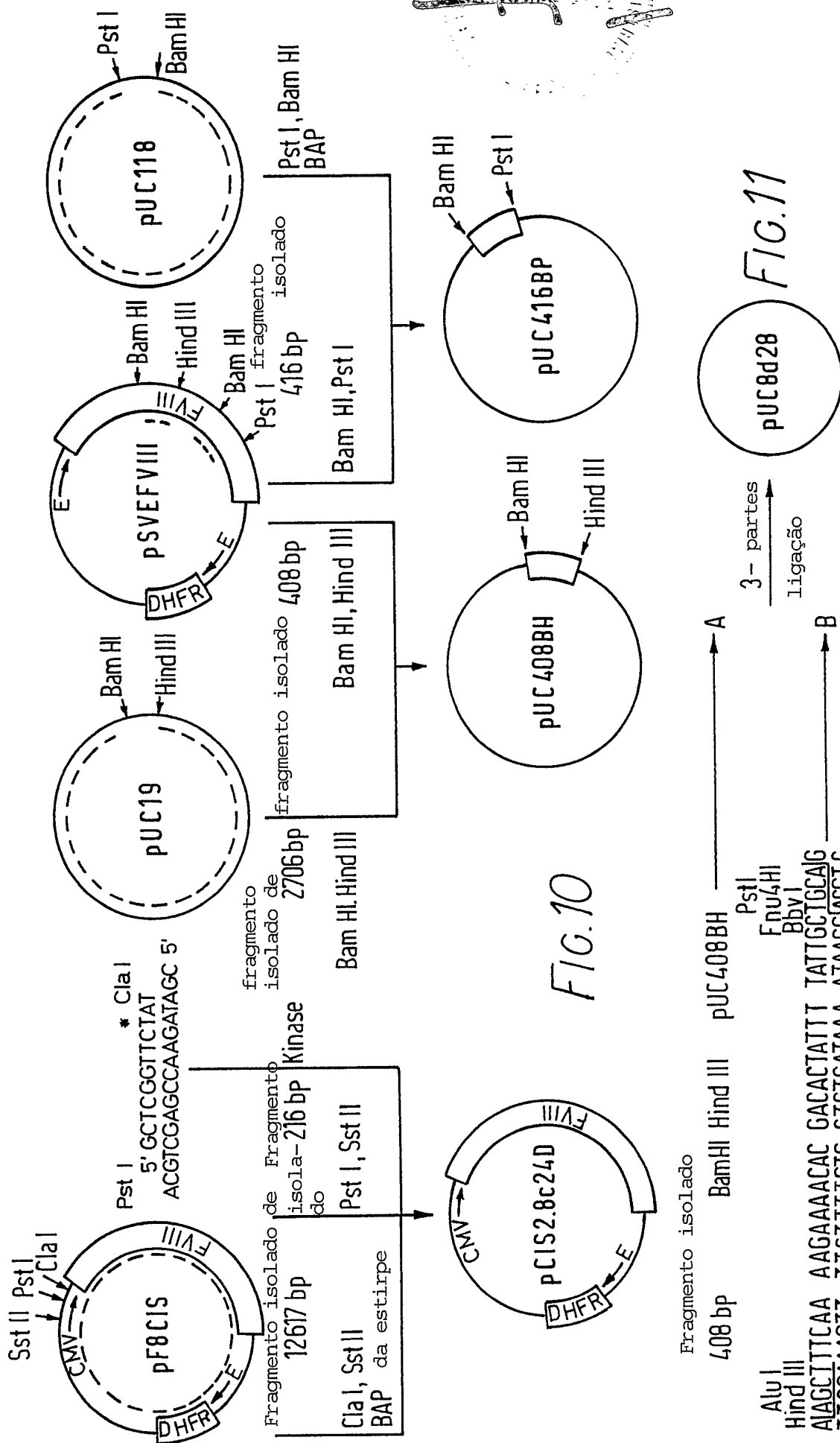


FIG 9 CONT'D



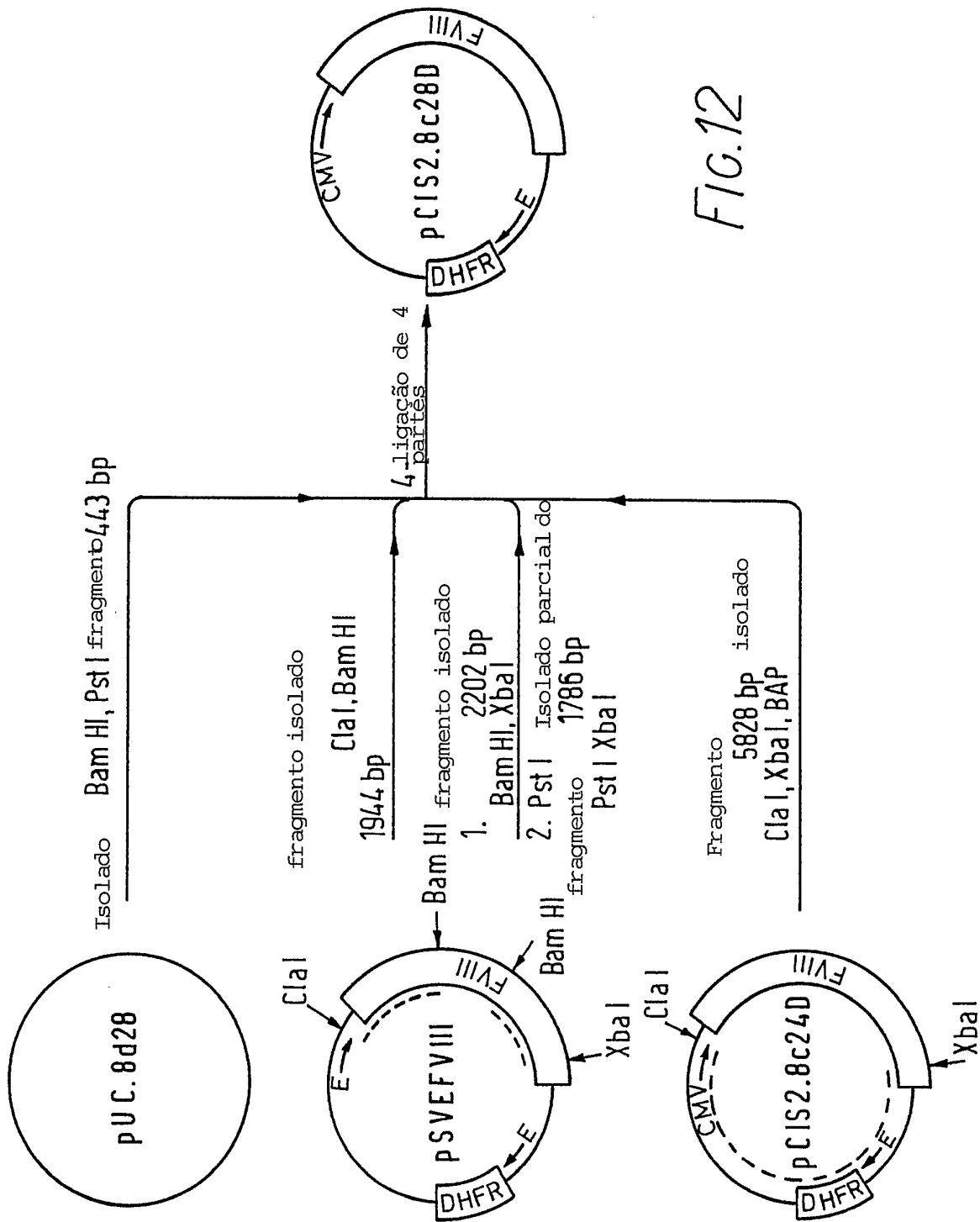


FIG.12